

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-505668  
(P2002-505668A)

(43) 公表日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 C 401/00		C 0 7 C 401/00	
A 6 1 K 31/045		A 6 1 K 31/045	
31/351		31/351	
A 6 1 P 3/00		A 6 1 P 3/00	
3/02	1 0 2	3/02	1 0 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-549630  
(86) (22) 出願日 平成10年5月15日 (1998.5.15)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年11月16日 (1999.11.16)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 0 0 6 2  
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 1 6 7 8  
(87) 国際公開日 平成10年11月19日 (1998.11.19)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 4 6 , 6 9 0  
(32) 優先日 平成9年5月16日 (1997.5.16)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ウィメン アンド インファンツ ホスピタル  
アメリカ合衆国 02905 ロードアイランド州プロビデンス、ダドリーストリート 101  
(72) 発明者 レディー サタヤナラヤナ ジー  
アメリカ合衆国 02806 ロードアイランド州パーリントン、ジョーンズサークル 3  
(74) 代理人 弁理士 石田 喜樹 (外1名)

最終頁に続く

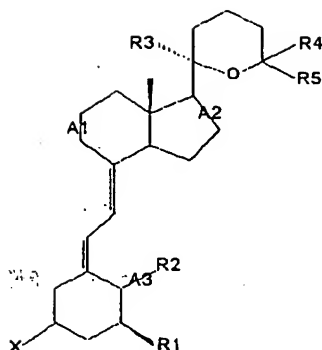
(54) 【発明の名称】 環状エーテルビタミンD3化合物、 $1\alpha$  (OH) 3-エピビタミンD3化合物及びそれらの使用法

(57) 【要約】

環状エーテルの側鎖を有する新規な環状エーテルビタミンD3化合物が開示される。これらの化合物は、最初に、環状エーテル構造の形成を触媒する新規な組織特異的代謝経路を通じて生成された3-エピビタミンD3の代謝産物として同定された。さらに、*in vivo*で $1\alpha$  (OH) ビタミンD3前駆体の3- $\beta$ ヒドロキシル基のエピマー化を通じて生成される、 $1\alpha$  (OH) 3-エピビタミンD3化合物も開示する。本発明のビタミンD3化合物は、天然及び合成のビタミンD3化合物の代用として利用が可能である。

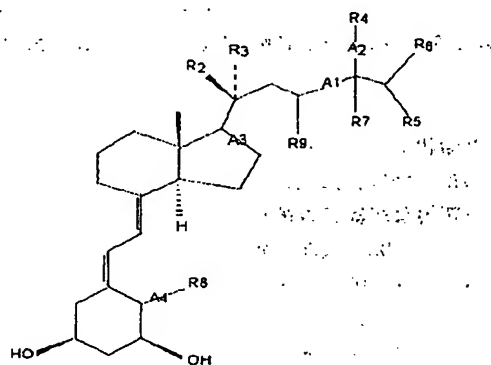
## 【特許請求の範囲】

## 1. 下の式(I) :



を有する、単離された環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物であって、ただしこの式においてA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 及びA<sub>3</sub> は単結合又は二重結合であり、X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 及びR<sub>5</sub> は、一個の水素、一個のハロゲン、一個のハロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のヒドロキシ-保護基、一個のアルキル、一個のアルケニル、一個のアルキニル、一個のアルコキシ、一個のアリール基、及び一個のヘテロ環式の基のうちのいずれかから選択される、単離された環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物。

## 2. 下の式II



を有する、単離された3-エピ型の1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物であって、ただしこの式においてA<sub>1</sub> は単結合、二重結合、又は三重結合であり、A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> 及びA<sub>4</sub> はそれぞれ個々に単結合又は二重結合のうちのいずれかから選択され、R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> 及びR<sub>9</sub> は個々に、一個の水素、一個のジューテリウム、一個のジューテロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のアルキル、一個のアルコキシド、一個のO-アシル、一個のハロゲン、一個のハロアルキル、一個のヒドロキシアルキ

ル、一個のアミン又はチオール基のうちのいずれかから選択され、そして一緒に捉えたときのR<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>、並びにR<sub>4</sub>及びR<sub>7</sub>の対は一個のカルボニル成分であり、そしてR<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、それぞれ個々に一個の水素、一個のジューテリウム、一個のハロゲン、一個のアルキル、一個のヒドロキシアルキル、一個のハロアルキル、及び一個のジューテロアルキルのうちのいずれかから選択される、単離された3-エピ型の1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物。

3. 1 $\alpha$  (OH) 3-エピビタミンD<sub>3</sub>、1 $\alpha$ , 24ジヒドロキシ3-エピビタミンD<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ヒドロキシ24-エチル3-エピビタミンD<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ヒドロキシ24-メチル3-エピビタミンD<sub>3</sub>又は1 $\alpha$ , 24-ジヒドロキシ24-メチル3-エピビタミンD<sub>3</sub>である、請求項2に記載の化合物。

4. ビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞の異常な活性を特徴とする異常を治療する方法であって、前記ビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞の異常な活性が低下するよう請求項1又は2のいずれかに記載の式(I)又は(II)を有するビタミンD<sub>3</sub>化合物を有効量、被験体に投与するステップを含む、方法。

5. 前記異常が、増殖過多皮膚細胞の異常な活性を含む、請求項4に記載の方法。

6. 前記異常が内分泌細胞の異常な活性を含む、請求項4に記載の方法。

7. 前記内分泌細胞が副甲状腺細胞であり、前記異常な活性が副甲状腺ホルモンのプロセッシング及び／又は分泌である、請求項6に記載の方法。

8. 前記異常が続発性副甲状腺機能亢進症である、請求項7に記載の方法。

9. 前記異常が骨細胞の異常な活性を含む、請求項8に記載の方法。

10. 前記異常が、骨粗鬆症、骨ジストロフィー、老年性骨粗鬆症、骨軟化症、くる病、のう胞性線維性骨炎、腎性骨ジストロフィー、続発性副甲状腺機能亢進症、硬変、及び慢性腎疾患のうちのいずれかがら選択される、請求項9に記載の方法。

11. 前記被験体が哺乳類である、請求項4に記載の方法。

12. 前記哺乳類がヒトである、請求項11に記載の方法。

13. カルシウム及びリン酸代謝の調節異常を改善する方法であって、カルシウム及びリン酸代謝の調節異常が改善するよう、請求項2又は3のいずれかに記載の3-エピビタミンD<sub>3</sub>化合物を治療上有効量、被験体に投与するステップを含む、方法。
14. 前記カルシウム及びリン酸代謝の調節異常が骨粗鬆症につながる、請求項13に記載の方法。
15. 治療上有効量の請求項1又は2のいずれかに記載のビタミンD<sub>3</sub>化合物と薬学的に容認可能な担体とを含む薬学的組成。
16. 局所又は経口投与に適している、請求項15に記載の組成。
17. 請求項1又は2のいずれかに記載のビタミンD<sub>3</sub>化合物を含む、梱包された化合物であって、ビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞の異常な活性を特徴とする異常を治療するために前記化合物を使用する際の指示書と共に梱包された、化合物。



## 【発明の詳細な説明】

環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物、 $1\alpha$  (OH)  $3$ -エピ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物  
及びそれらの使用法

発明の背景

高等生物の生体系におけるビタミンDの重要性はメランビーが1920年にそれを発見して以来認識されている (Mellanby, E. (1921) Spec. Rep. Ser. Med Res. Council (GB) SRS61:4)。骨格の正常な発達、及びカルシウム及びリン酸のホメオスタシス維持にとって必須な「ビタミン」にビタミンDが公式に分類されたのは1920年から1930年までに渡る間であった。

ビタミンD<sub>3</sub> (コレカルシフェロール) の代謝に関連する研究は、血漿代謝産物である25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> [ $25$  (OH) D<sub>3</sub>] (Blunt, J. W. et al. (1968) Biochemistry 6:3317-3322) 及びそのホルモン活性型である $1\alpha$ ,  $25$  (OH)  $2$  D<sub>3</sub> (Myrtle, J. F. et al (1970) J. Biol. Chem. 245:1190-1196; Nonnan, A. W. et al. (1971) Science. 173:51-54; Lawson, D. E. M. et al (1971) Nature 230:228-230; Holick, MF. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:803-804) の発見及び化学的性格付けに始まった。ビタミンD内分泌系の概念の形成は、細かく調節された態様で $1\alpha$ ,  $25$  (OH)  $2$  D<sub>3</sub> を生成する上での腎臓の主要な役割の解明 (Fraser, D. R. and Kodick, E (1970) Nature 288:764-766; Wong, R. G. et al (1972) J. Clin. Invest. 51:1287-1291) と、腸管内における $1\alpha$ ,  $25$  (OH)  $2$  D<sub>3</sub> の核レセプタ (VD<sub>3</sub> R) の発見 (Haussler, M. R. et al. (1969) Exp. Cell Res. 58:234-242; Tsai, H. C. and Norman, A. W. (1972) J. Biol. Chem. 248:5967-5975) の両方に依拠していた。ビタミンD内分泌系の作用は以下のものに依存している。即ち、第一に、 $1\alpha$ ,  $25$  (OH)  $2$  D<sub>3</sub> 及び $24R$ ,  $25$  (OH)  $2$  D<sub>3</sub> などの生活性の代謝産物へのビタミンD<sub>3</sub> の転化を行なうチトクロームP450酵素が肝臓内 (Bergman, T. and Postlind, H. (1991) Biochem. J. 276:427-432; Ohyama, Y and Okuda, K. (1991) J. Biol. Chem. 266: 8690-8695) 及び腎臓内 (Henry, H. L. and Norman, A. W. (1974) J. Biol. Chem. 249:7529-7535; Gray, R. W. and Ghazarian, J. G (1989) Biochem. J. 259:561-568) 並びにその他様々な組織に存在していること、そして第二に、ビタミンD内分泌系の様々な組織構成要素にこれらの疎水性分子の選択的輸送及び送達を行なう血漿ビタミンD結合たんぱく (DBP) が存在すること (Van Baelen, H. et al. (1988) Ann NY Acad Sci. 5

38:60-68;Cooke, N. E. and Haddad, J. G. (1989) Endocr. Rev. 10:294-307;Bikle, D. D. et al. (1986) J. Clin. Endocrinol. Metab.

63:954-959)、そして第三に、アゴニストである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と相互作用する幅広い標的組織に、このセコステロイドホルモンにとって必要な特異的生物学的反応を生ずる立体選択的レセプタが存在すること(Pike, J. W. (1991) Annu. Rev. Nutr. 11:189-216)である。今日では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の核レセプタ( $\text{VD}_3\text{R}$ )が30を超える組織及び癌細胞系に存在するという証拠がある(Reichel, H. and Norman, A. W. (1989) Annu. Rev. Med. 40:71-78)。

ビタミン $\text{D}_3$ 及びそのホルモン活性型はカルシウム及びリン酸のホメオスタシスのよく知られた調節物質である。これらの化合物はカルシウム及びリン酸の腸管吸収、骨ミネラルの移動、及び腎臓内のカルシウム保持のうちの少なくとも一つを刺激することが知られている。さらに、30を超える組織に特異的ビタミン $\text{D}$ レセプタが存在するという発見により、ビタミン $\text{D}_3$ はその伝統的なカルシウム/骨のホメオスタシスという役割を持つ他にも多能性の調節物質であるということが解明された。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対するパラ分泌の役割が、ビタミン $\text{D}_3$ をその活性型に酸化させることのできる、例えば $25\text{-OHD-}1\alpha\text{-ヒドロキシラーゼ}$ などの酵素と、骨、ケラチノサイト、胎盤、及び免疫細胞などのいくつかの組織中の特異的レセプタとが組合せの形で存在することにより、示唆されてきた。さらに、ビタミン $\text{D}_3$ ホルモン及び活性代謝産物は、正常細胞及び腫瘍細胞の両方の細胞増殖及び分化を調節することができることが判明している(Reichel, H. et al. (1989) Ann. Rev. Med. 40:71-78)。

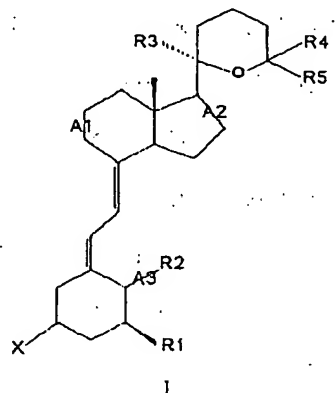
ビタミン $\text{D}_3$ 及びその代謝産物には多能性の活性があることから、これら化合物の合成類似体の開発に多くの関心が向けられてきた。しかしながら、ビタミン $\text{D}_3$ 及びその構造上の類似体の臨床での利用には、高カルシウム血症につながる *in vivo*でのカルシウム及びリン酸のホメオスタシスの調節異常など、被験体への投与後に望ましくない副作用がこれらの化合物により引き起こされるために、限界があった。

#### 発明の概要

本発明は、環状エーテルの側鎖を有する、ここで「環状エーテルビタミンD3化合物」と呼ばれると共に、式Iで表されるビタミンD3化合物の発見に少なくとも部分的に基づくものである。本発明はさらに、式IIで表される、3-エピ型の $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD3化合物を説明するものでもある。以後、ここで「式I及びIIのビタミンD3化合物」と呼ばれる、式I及びIIのそれぞれ環状エーテル及び $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD3化合物は、例えばケラチノサイト、骨細胞など、特定の組織でエピマー化3- $\beta$ -ヒドロキシ-ビタミンD3を触媒する

経路を通じてin vivoで生成が可能である。本発明のビタミンD3化合物は、天然及び合成型ビタミンD3の代用として利用することができる。

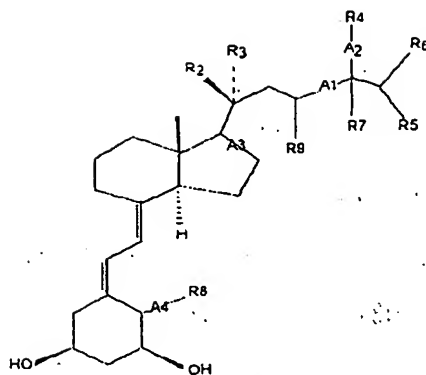
従って、本発明は、下記の式(I)：



を有する環状エーテルビタミンD3化合物に関するものであり、ただしこの式においてA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 及びA<sub>3</sub> は単結合又は二重結合を表し、X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 及びR<sub>5</sub> は、例えば個々に一個の水素、一個のハロゲン、一個のハロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のヒドロキシ-保護基、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、一個のアルケニル、一個のアルキニル、一個のアルコキシ、一個のアリール基及び一個のヘテロ環式の基のうちのいずれかから選択することができる。X基の配向は $\alpha$ 又は $\beta$ 配置のいずれでもよい。

ある好適な実施例では、本環状エーテルビタミンD3化合物は、その3-エピ配置になっており、このときA環に対するX基の配向は $\alpha$ 配置である。

本発明はさらに、下記の式II：



## II

を有する3-エピ型の1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD3化合物に関するが、ただしこの式において、A1は、単結合、trans-二重結合、cis-二重結合などの二重結合、又は三重結合を表し、A2、A3及びA4は単結合又は二重結合を表し、R2、R3、R4、R7、R8及びR9は、例えば個々に一個の水素、一個のジューテリウム、一個のジューテロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、例えば一個のC1-C4アルキル、一個のアルコキシド、一個のO-アシル、一個のハロゲン、例えば一個のフッ化物、一個のハロアルキル（例えば一個のフルオロアルキル、-CF3など）、一個のヒドロキシアルキル、例えばそのアルキル基が一個のC4-C10アルキルであるようなヒドロキシアルキル、一個のアミン又は一個のチオール基のうちのいずれかから選択することができ、そして一緒に捉えたときのR2及びR3、

又はR4及びR7の対が、例えば一個のカルボニル成分( $\text{>C=O}$ )などとしての一個の酸素原子

でもよく、そしてR5及びR6は、例えばそれぞれ個々に、一個の水素、一個のジューテリウム、一個のハロゲン、例えば一個のフッ化物、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、例えば一個のC1-C4アルキル、一個のヒドロキシアルキル、一個のハロアルキル、例えば一個のフルオロアルキル、及び一個のジューテロアルキルのうちのいずれかから選択することができる。R2、R3、R4、R7、R8及びR9のアミン又はチオール基は置換されて、例えば第一級又は第二級アミン、又は第一級又は第二級チオールを形成してもよいが、このときの置換基は一個のアルキル

又は一個のアリール基、例えば2から10個の炭素原子を有する一個の置換基などであってもよい。

別の態様では、本発明はさらに、式I又はIIを有する、治療上有効量のビタミンD3化合物と、薬学的に容認可能な担体とを含む薬学的組成に関するものである。

さらに別の態様では、本発明は、ビタミンD3応答性細胞の生活性を調節する方法を提供する。本方法は、前記細胞の活性の調節が起きるように、前記細胞を有効量の単離された式I及びIIのビタミンD3化合物に接触させるステップを含む。

本発明の別の態様は、被験体において細胞の異常な成長又は活性を特徴とする異常を治療する方法を提供するものであり、前記細胞の成長又は活性が減少するよう、被験体に対し、式I及びIIのビタミンD3化合物による有効量の薬学的組成を投与するステップを含む。

ある好適な実施例では、治療に用いられるこの式I及びIIのビタミンD3化合物は、安定性がより高い及び／又は毒性がより低いなど、ビタミンD3に比較して向上した生物学的性質を有する。

ある一つの態様では、増殖過多性皮膚細胞の増殖を阻害する、及び／又は、分化を誘導する方法が提供されるが、ただしこの増殖過多性皮膚細胞は、表皮細胞又は上皮細胞でよい。従って、乾癬などの増殖過多性皮膚異常を治療するための治療法が提供される。

いくつかの実施例では、I又はIIに示されたような式を有するビタミンD3化合物の薬学的製剤を、新形成細胞の成長を阻害するのに有効量、投与するなどにより、ビタミンD3応答性の新形成細胞の異常な細胞成長を特徴とする異常を治療又は予防するために、本発明を利用することができる。

別の態様では、当該方法を用いて免疫応答を調節することができ、被験体の免疫機能を変更するためにビタミンD化合物の薬学的製剤を被験体に投与するステップを含む。ある一つの実施例では、例えばT細胞の活性を低下させる、IL-2及びIFN- $\gamma$ などのリンフォカインの産生を減少させる、T細胞の増殖を低下させる、など、T細胞やナチュラルキラー細胞などのリンパ細胞の治療に本発明を利用

することができる。好適な実施例では、当該方法を移植片拒絶反応、自己免疫及び炎症の治療に用いることができる。

さらに別の態様では、本発明のビタミンD<sub>3</sub>化合物は、カルシウム及びリン酸代謝の調節異常を特徴とする異常の治療に有用であり、被験体に対し、式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物の薬学的製剤を投与することでカルシウム及びリン酸代謝の調節異常を改善するステップを含む。

ある好適な実施例では、前記異常は骨粗鬆症である。別の実施例では、式I及びIIの当該ビタミンD<sub>3</sub>化合物を用いてカルシウム及びリン酸の代謝のその他の調節異常を特徴とする疾患を治療することができる。

別の態様では、式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物を用いて副甲状腺細胞におけるPTH分泌を阻害する方法を提供する。さらに、続発性副甲状腺機能亢進症を治療する治療法も提供される。

さらに別の態様では、本発明は、ニューロン細胞などのビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞を式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物に接触させてニューロン喪失を防止する又は遅らせることにより、ニューロン喪失を防止する又はニューロン喪失から防御する方法を提供するものである。

またさらに別の態様では、本発明は、ビタミンD<sub>3</sub>応答性平滑筋細胞を式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物に接触させて前記細胞を活性化する、又は好ましくはその活性を阻害することにより、血管平滑筋細胞の活性を調節する方法を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、266ビタミンD<sub>3</sub>化合物の化学構造の編纂（その中に描がれた図面も含めたその内容を参考として編入することとするBoullion, R. et al. (1995) *Endocrinology Reviews* 16 (2):200-257) である。各類似体はその化学名及び一字、二字、又は三字の同定記号により同定されている。

図2は、1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>-3-エピビタミンD<sub>3</sub>と一緒にインキュベートされたヒトケラチノサイトで産生した代謝産物のHPLC輪郭及びUVスペクトルを示す。

図3は、1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>-3-エピビタミンD<sub>3</sub>及びその環状エーテル代謝産物の質量

スペクトルを示す。

図4は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-3-エピビタミンD}_3$ の環状エーテル代謝産物を形成する代謝経路の案を示す。

図5Aは、ラット骨肉腫細胞株(UMR106)における $1\alpha(\text{OH})\text{-ビタミンD}_3$ のその3エピ型への代謝を示す。

図5Bは、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の $1\alpha(\text{OH})\text{-3-エピビタミンD}_3$ への3-エピマー化の概略図である。

図6は、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 及びその3-エピ代謝産物の質量スペクトルを示す。

図7は、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ と一緒に24、48、又は84時間インキュベートされた、ラット骨肉腫細胞株(UMR106)において産生した代謝産物のHPLC輪郭及びUVスペクトルを示す。

#### 発明の詳細な説明

「環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物」という言語は、一般式Iで表されるような、3-エピマー型及び非3-エピマー型のビタミンD<sub>3</sub>を含む、環状エーテルの側鎖を有するあらゆるビタミンD<sub>3</sub>化合物を含むものとして意図されている。

ここで用いられる場合の「3-エピビタミンD<sub>3</sub>」又は「3-エピD<sub>3</sub>」化合物という術語は、 $\alpha$ 位の置換基、例えば一個の官能基、例えば一個のヒドロキシル基、をA環の3位置にある炭素に $\beta$ -配置ではなく $\alpha$ -配置で結合させたビタミンD<sub>3</sub>化合物を含むものとして意図されている。「3-エピ型の $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物」又は「 $1\alpha$ -ヒドロキシ-3-エピビタミンD<sub>3</sub>化合物」という言語は、そのヒドロキシル基を、A環の3位置にある炭素に $\beta$ 配置ではなく $\alpha$ 配置に結合させた、以下に詳述するような一般式IIで表される $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物を含むものとして意図されている。

ここで以下、「式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物」と呼ばれる、それぞれ式I及びIIの環状エーテル及び $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物は、in vivoにおいて、ケラチノサイト又は骨細胞など、特定の組織でエピマー化3-13化ドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>を触媒する経路による生成が可能である。

「ビタミンD<sub>3</sub>化合物」又は「コレカルシフェロール」(ここでは「D<sub>3</sub>化合物」

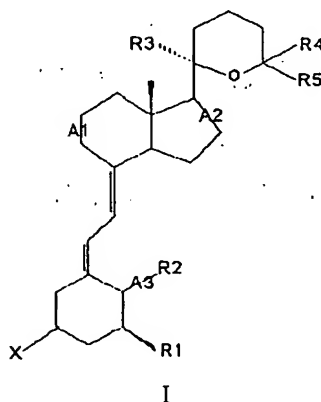
としても言及される) という言語は、ビタミンD<sub>3</sub>に構造上類似の化合物を含むものとして意図されている。これらの化合物の数多くは当業者に認識されており、数多くの天然の前駆体、代謝産物や、ホルモン活性のある1 $\alpha$ -25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> (1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) の合成類似体も含む。この言語は、ビタミンD<sub>3</sub>及びその代謝段階でのあらゆる類似体や、異なる代謝型のビタミンD<sub>3</sub>又はその類似体の混合

物を含むものとして意図されている。「ビタミンD<sub>3</sub>化合物」という術語には、さらに、図1に示されたビタミンD<sub>3</sub>の合成類似体が含まれる。

ここに提供した式では、多種の置換基はステロイドの核に以下の標記のうちの一つにより結合しているものとして描かれている。即ち、点線 (---) は $\beta$ -配向 (即ち環

平面の上方) にある置換基を示し、楔形の実線 (→) は $\alpha$ -配向 (即ち分子平面の下方) にある置換基を示し、又は実線 (—) は環平面内にある置換基を示す。ステロイド分野での立体化学上の決まりは、点線が $\alpha$ -配向 (即ち分子平面の下方) にある置換基を表し、楔形の実線が $\beta$ -配向 (即ち環平面の上方) にある置換基をあらわす一般的な化学分野とは反対であることは理解されねばならない。示されたように、ホルモン1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のA環は、キラル炭素-1及び-3の位置に二つの非対称な中心を含んでおり、それぞれが、良く特徴付けられた配置の一個のヒドロキシル基、即ち1 $\alpha$ -及び3 $\beta$ -ヒドロキシル基を含んでいる。

従って、本発明は以下のような式 (I) :



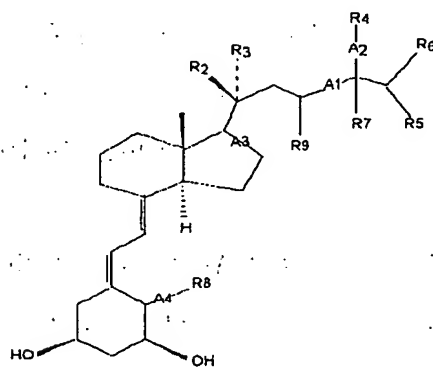


を有する環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物に関するものであるが、ただしこの式においてA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>及びA<sub>3</sub>は単結合又は二重結合を表し、X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は、例えば個々に一個の水素、一個のハロゲン、一個のハロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のヒドロキシ-保護基、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、一個のアルケニル、一個のアルキニル、一個のアルコキシ、一個のアリール基、及

び一個のヘテロ環式の基のうちのいずれかから選択することができる。X基の配向は、 $\alpha$ -又は $\beta$ -配置のいずれでもよい。

ある好適な実施例では、本環状エーテルビタミンD<sub>3</sub>化合物は一般式Iで表されるが、このときA環に対するX基の配向は $\alpha$ -配置であり、A<sub>1</sub>は単結合であり、A<sub>2</sub>及びA<sub>3</sub>はそれぞれ二重結合であり、-X及びR<sub>1</sub>はヒドロキシル基であり、R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は一個の水素である。


本発明はさらに式II



II

を有する3-エピ型の1 $\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>化合物に関するものであるが、ただしこの式においてA<sub>1</sub>は単結合、trans-二重結合、cis-二重結合などの二重結合、又は三重結合を表し、A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>及びA<sub>4</sub>は単結合又は二重結合を表し、R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>は、例えば個々に一個の水素、一個のジューテリウム、一個のジューテロアルキル、一個のヒドロキシ、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、例えば一個のC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、一個のアルコキシド、一個のO-アシル、一個のハロゲン、例えば一個のフッ化物、一個のハロアルキル（例えば一個のフルオ

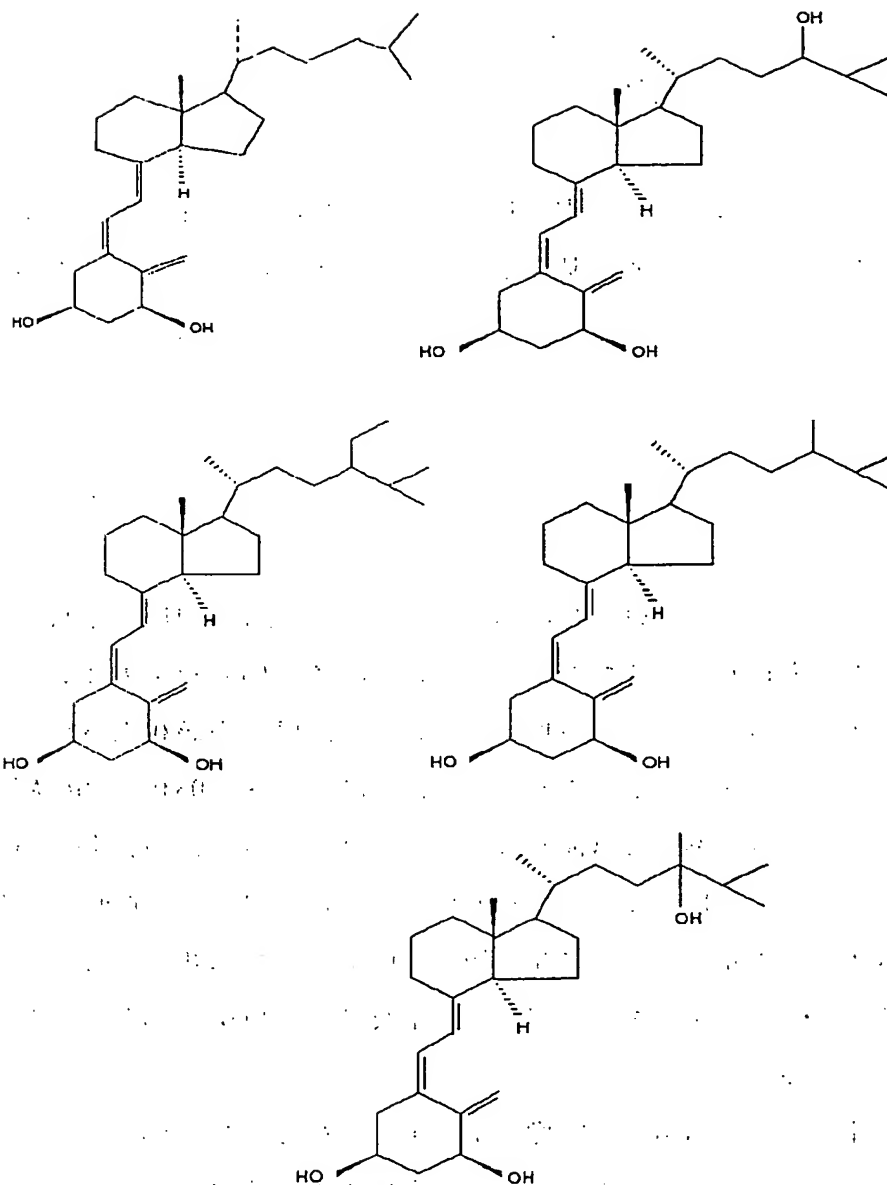
ロアルギル、 $-\text{CF}_3$ ）、一個のヒドロキシアルキル、例えばそのアルキル基が一個の $\text{C}_4$ - $\text{C}_{10}$ アルキルであるような一個のヒドロキシアルキル、一個のアミン又はチオール基のうちのいずれかから選択することができ、そして一緒に捉えたときの $\text{R}_2$ 及び $\text{R}_3$ 、

又は $\text{R}_4$ 及び $\text{R}_7$ の対は、例えば一個のカルボニル成分()としての一個の酸

素原子でもよく、そして $\text{R}_5$ 及び $\text{R}_6$ は、例えばそれぞれ個々に一個の水素、一個のジューテリウム、一個のハロゲン、例えば一個のフッ化物、一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、例えば一個の $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ アルキル、一個のヒドロキシアルキル、一個のハロアルキル、例えば一個のフルオロアルキル、及び一個のジューテロアルキルのうちのいずれかから選択することができる。 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_7$ 、 $\text{R}_8$ 及び $\text{R}_9$ のアミン又はチオール基は、置換されて例えば第一級又は第二級アミン、又は第一級又は第二級チオールを形成してもよく、このときこの置換基は一個のアルキル又は一個のアリール基、例えば2から10個の炭素原子を有する一個の置換基など、であってもよい。

ある好適な実施例では、 $\text{A}_1$ 、 $\text{A}_2$ 及び $\text{A}_3$ はそれぞれ単結合であり、 $\text{A}_4$ は二重結合であり、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_5$ 、 $\text{R}_6$ 、 $\text{R}_8$ 及び $\text{R}_9$ はそれぞれ一個の水素又は一個のアルキル、例えば一個のメチルなど、であり、そして $\text{R}_4$ 及び $\text{R}_7$ はそれぞれ一個の水素、一個のヒドロキシ、又は一個のアルキル、例えば一個の低級アルキル、例えば一個のメチル又は一個のエチル基など、である。 $\text{R}_4$ 及び $\text{R}_7$ により置換される位置のキラリティーはR-又はS-配置のいずれでもよい。

式IIの包含する好適な1 $\alpha$ -ヒドロキシビタミン $\text{D}_3$ 化合物の例には、以下の化学式：



を有する $1\alpha$ 、ヒドロキシ3-エピビタミン $D_3$ 、 $1\alpha$ 、24ジヒドロキシ3-エピビタミン $D_3$  ( $1\alpha$ 、24R-ジヒドロキシ3-エピビタミン $D_3$  及び $1\alpha$ 、24S-ジヒドロキシ3-エピビタミン $D_3$  の両方)、 $1\alpha$ ヒドロキシ24-エチル3-エピビタミン $D_3$ 、 $1\alpha$ ヒドロキシ24-メチル3-エピビタミン $D_3$  及び $1\alpha$ 、24-ジヒドロキシ24-メチル3-エピビタミン $D_3$  が含まれる。

3-エピ転化前の $1\alpha$ -ヒドロキシ-ビタミン $D_3$ の図解もまた、図1では類似体BPとして描かれている。

更に別の態様では、本発明は、ビタミン $D_3$ の生活性の少なくとも一つを有する

と共に、in vivoでの優れた安定性及び／又は毒性が低いなど、ビタミンD<sub>3</sub>と比較して向上した生物学的性質を有する、式I及びIIの単離されたビタミンD<sub>3</sub>化合物を提供するものである。

「エピマー」又は「エピ」化合物という術語は、天然発生型の（又は参照となる）化合物に比較して、置換基に単結合した炭素の配向が様々であるキラル炭素、例えば、置換基への結合の配向が $\beta$ -配置ではなく $\alpha$ -配置であるような炭素など、を有

する化合物を含むものとして意図されている。一般式I及びIIを有する3-エピマー型のビタミンD<sub>3</sub>化合物は、一個のヒドロキシル基などの一個の置換基を、 $\beta$ -配置ではなく $\alpha$ -配置でA環の3位置にある炭素に結合させており、一方、このときその他の置換基はいずれも、 $\alpha$ -又は $\beta$ -配置のいずれでもよい。

ここで用いられる場合の「置換基」という術語は、当該化合物が、それに意図された機能を果たすことができるように、当該ビタミンD<sub>3</sub>化合物のA環の3位置炭素に結合した成分、例えば官能基など、を言う。従って、置換基という術語は、水素、ハロゲン、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシ-保護基、アルキル、例えば低級アルキル、アルケニル、例えば低級アルケニル、アルキニル、例えば低級アルキニル、アルコキシ、アリール基及びヘテロ環式の基を含むものとして意図されている。

「キラル」という術語は、鏡像相手が重ね合わせられないといった性質を有する分子を言い、一方、「アキラル」という術語は、それらの鏡像相手に重ねあわせることのできる分子を言う。「立体異性体」又は「異性体」という術語は、同一の化学構造を有するが、空間中における原子又は基の配置の異なる化合物を言う。特に、「エナシチオマー」は、ある化合物に対する、相互に鏡像を重ねることのできない二つの立体異性体を言う。二つのエナシチオマーの等モル混合物は「ラセミ混合物」又は「ラセミ化合物」と呼ばれる。「ジアステレオマー」は、非対称の二つ又はそれ以上の中心を持つと共に、分子が相互の鏡像になっていない立体異性体を言う。キラルの中心の名称に関しては、「d」及び「l」配置という術語はIUPACの推奨により規定された通りである。術語の利用に関しては、ジ

アステレオマー、ラセミ化合物、エピマー、及びエナンチオマーは、調製の立体化学を説明するそれらの普通のコンテキストで用いられることであろう。

ここで用いられる場合の「ビタミンD<sub>3</sub>の異性体」又は「非エピマー型」という言語は、ビタミンD<sub>3</sub>化合物の立体異性体を言う。例えば、3-ヒドロキシ基を $\beta$ -配置の配向で有するビタミンD<sub>3</sub>化合物である。

「単離された」又は「概ね精製された」という術語は、ここで互換可能に用いられる場合、天然では起きない状態のビタミンD<sub>3</sub>化合物を言う。この化合物は、細胞物質、又は、天然で精製された場合には培養媒質、化学合成された場合には化学的前駆体又はその他の化学物質を概ね含んでいなくともよい。別の好適な実施例では、「単離された」または「概ね精製された」という術語は、さらに、エナンチオ

マーのうちの一つを実質的に欠くキラル化合物の製剤、即ち、ある分子の、エナンチオマー的に濃縮された製剤又はラセミでない製剤、を言う。同様に、単離されたエピマー又はジアステレオマーは、その他の立体化学型を概ね含まないキラル化合物の製剤を言う。例えば、単離された又は概ね精製されたビタミンD<sub>3</sub>化合物には、A環の3位置にあるキラル炭素に $\alpha$ -配置で置換基を結合させた立体異性体について濃縮された、従って $\beta$ -配置を有するその他の異性体を概ね欠いた、ビタミンD<sub>3</sub>の合成又は天然の製剤が含まれる。特にそうでないと明記する場合を除き、このような術語は、 $\alpha$ 型の $\beta$ 型に対する比率が重量比で1:1より大きなビタミンD<sub>3</sub>組成を言うものである。例えば $\alpha$ エピマーの単離された製剤は、 $\beta$ 立体異性体に対して重量で50%を超える、より好ましくは少なくとも重量で75%の、そしてさらにより好ましくは少なくとも重量で85%の $\alpha$ -エピマーを有する製剤を意味する。もちろん、この濃縮は、 $\beta$ 立体異性体に対して90%を超える、そしてさらにより好ましくは95%を超える $\alpha$ -エピマーを有する化合物の製剤を言う「概ねエピマー濃縮されて」いることを条件に、85%をはるかに超えていてもよい。「 $\beta$ 立体異性体を概ね含まない」という術語は、同じような純度範囲を持つものとして理解されよう。

ここで用いられる場合の「アルキル」という言語は当業において認識されてお

り、直鎖アルキル基、枝分かれ鎖アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基、及びシクロアルキル置換アルキル基を含めた、飽和脂肪族の基のラジカルがこれに含まれる。好適な実施例では、直鎖又は枝分かれ鎖アルキルは、30個又はそれより少ない炭素原子をその主鎖に（例えば直鎖の場合  $C_1-C_{30}$ 、枝分かれ鎖の場合  $C_3-C_{30}$ ）有し、そしてより好ましくは20又はそれより少ない炭素原子を有するとよい。同様に、好適なシクロアルキルは、4から10個の炭素原子をその環構造に有するものであり、より好ましくは5、6又は7個の炭素をその環構造に有するとよい。

炭素の数を特に他に明記する場合を除き、ここで用いられる場合の「低級アルキル」は、上に定義した一個のアルキル基であって、1から10個の炭素、より好ましくは1から6個、そして最も好ましくは1から4個の炭素原子をその主鎖構造に有するものを意味するが、この主鎖構造は直鎖でも枝分かれ鎖でもよい、この主鎖構造は直鎖でも枝分かれ鎖でもよい。低級アルキル基の例には、メチル、エチル、*n*-プロピル、1-プロピル、*t*-ブチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、等々がある。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」

は同様の鎖長を有するものである。好適なアルキル基には低級アルキルが含まれる。アルキレン基の例はメチレン、エチレン、プロピレン、等々である。

さらに、ここでアルキルという術語には、「未置換アルキル」及び「置換アルキル」の両方が含まれるものとして意図されており、この後者はその炭化水素の主鎖の一個又はそれ以上の炭素に付いた一個の水素が置換基に置き換えられたアルキル成分を言う。このような置換基には、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（アルデヒド、ケトン、カルボキシレート、及びエステルを含む）、アルコキシル、エーテル、ホスホリル、シアノ、アミノ、アシルアミノ、アミド、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオールカルボニル（チオールギ酸、チオールカルボン酸、及びチオールエステルを含む）、スルホニル、ニトロ、ヘテロシクリル、アラルキル、又は芳香族又はヘテロ環式芳香族の成分を含めることができる。当業者であれば、炭化水素の鎖で置換される成分は、それ自体、適切であれば置換されてもよいことは理解されよう。例え

ば、置換アルキルの置換基には、置換される又は置換されない型のアミノ、アシルアミノ、イミノ、アミド、ホスホリル(ホスホネート及びホスフィネートを含む)、スルホニル(硫酸塩、スルホナート、スルファモイル、及びスルホシアミドを含む)、及びシリル基や、エーテル、アルキルチオ、アリールチオ、カルボニル(ケトン、アルデヒド、カルボキシレート、及びエステルを含む)、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、等々を含めてもよい。置換アルキルの例は下に説明されている。シクロアルキルはさらに、アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルキルチオ、アリールチオ、アミノアルキル、カルボニル-置換アルキル、 $-CF_3$ 、シアノ( $-CN$ )、等々で置換されてもよい。

ここで用いられる場合の「アラルキル」という術語は、一個のアリール基(例えば芳香族又はヘテロ環式芳香族の基)で置換される一個のアルキル基を言う。

「アルケニル」及び「アルキニル」という術語は当業において認識されており、上記のアルキルに長さが類似でかつ置換が可能な不飽和脂肪族の基であって、しかしそれぞれ少なくとも一つの二重又は三重結合を含むものがこれらに含まれる。

「アルコキシル」という術語は当業において認識されており、式-0-アルキルで表される基がこれに含まれる。アルコキシル基の例には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、*t*-ブトキシ、等々がある。特に他に明記する場合を除き、「アルコキシ」基は、-0-アルケニル、-0-アルキニル、-0-アリール(即ちアリールオキシ基)、又は-0-ヘテロシクリルで表される基に

置換されてもよい。「エーテル」は、一個の酸素により共有結合した二つの置換される又は置換されない炭化水素である。従って、例えば一個のアルキルをエーテルにするアルキルなどの置換基は、-0-アルキル、-0-アルケニル、-0-アルキニル、-0-アリール、又は-0-ヘテロシクリルのうちの一つで表すことのできるものなど、アルコキシルであったり、又はアルコキシルに似たものである。「低級アルコキシ」という術語には、その分子の残りの部分に酸素により結合した一個の低級アルキル基が含まれる。

アルコキシ基の例には、メトキシ、エトキシ、イソプロポキシ、*t*-ブトキシ、

等々がある。「フェニルアルコキシ」という術語は、フェニル環で置換される一個のアルコキシ基を言う。フェニルアルコキシ基の例は、ベンジルオキシ、2-フェニルエトキシ、4-フェニルブトキシ、等々である。「アルカノイルオキシ基」という術語は、カルボキシル基のヒドロキシル部分から水素が取り除かれることにより形成された一個のアルキルカルボン酸の残基を言う。アルカノイルオキシ基の例には、ホルミルオキシ、アセドキシ、ブチリルオキシ、ヘキサノイルオキシ、等々がある。「フェニル」に用いられるときの「置換される」という術語は、以下の基、即ち、アルキル、ハロゲン(即ち、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素)、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチル、等々のうちの一つ又はそれ以上で置換されるフェニルを言う。「アルカノール」又は「ヒドロキシアルキル」とは、アルコキシ基の酸素原子のプロトン付加により得られる化合物を言う。アルカノールの例には、メタノール、エタノール、2-プロパノール、2-メチル、-2-プロパノール、等々がある。

ここで用いられる場合の「ヒドロキシ保護基」という術語には、例えばアシル又はアルキルシリル基、例えばトリメチル、シリル、トリエチル、シリル、*t*-ブチルジメチル、シリル及び類似のアルキル化シリルラジカル、又はアルコキシアルキル基、例えばメトキシメチル、エトキシメチル、メトキシエトキシメチル、テトラヒドロフランニル又はテトラヒドロピラニルなど、その後の反応の際にヒドロキシの官能を保護するために通常用いられるあらゆる基が含まれる。「保護されたヒドロキシ」とは、上記のヒドロキシ保護基群の一つにより誘導化された一個のヒドロキシ官能である。

ここで用いられる場合、「ハロゲン」という術語は-F、-Cl、-Br又は-Iを指し、「スルフヒドリル」又は「チオール」という術語は-SHを意味し、「ヒドロキシル」という術語は-OHを意味する。

「アリール」という術語は当業において認識されており、0から4個のヘテロ原子が含まれていてもよい5員環及び6員環の単一環芳香族の基がこれに含まれ、例えばベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン及び



ピリミジン、等々である。アリール基にはさらに、ナフチル、キノリル、インドリル、等々などの多環式の縮合芳香族の基が含まれる。環構造にヘテロ原子を有するようなアリール基もまた、「アリールヘテロ環」、「ヘテロアリール」又は「ヘテロ芳香族」と呼ばれる場合がある。この芳香族の環は、一つ又はそれ以上の環位置で、上記のような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルギル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、アシルアミノ、アジド、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、アミジノ、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、アリールチオ、スルホニル、スルホンアミド、スルファモイル、ケトン、アルデヒド、エステル、一個のヘテロシクリル、一個の芳香族又はヘテロ環式芳香族の成分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、等々で置換されてもよい。アリール基はさらに、芳香族でない脂環式又はヘテロ環式の環に縮合又は架橋されて多環(例えばテトラリン)を形成していてもよい。

「ヘテロシクリル」又は「ヘテロ環式の基」という術語は当業において認識されており、3から10員環の環構造、より好ましくは4から7員環の環構造であって、1個から4個のヘテロ原子を含む環構造がこれに含まれる。ヘテロシクリル基にはピロリドン、オキサラン、チオラン、イミダゾール、オキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、ラクトン、例えばアゼチジノン及びピロリジノンなどのラクタム、ラクトン、スルタム、スルトン、等々がある。ヘテロ環式の環は、一つ又はそれ以上の位置で、上記したような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルギル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、アシルアミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、アリールチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、一個のヘテロシクリル、一個の芳香族又はヘテロ環式芳香族の成分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、又は等々などで置換されてもよい。

「ポリシクリル」又は「多環式の基」という術語は当業において認識されており、二つ又はそれ以上の炭素が二つの隣り合った環に共有されている、例えばこれらの環が「縮合

環」であるなど、の二つ又はそれ以上の環状の環（例えばシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び/又はヘテロシクリル）がこれに含まれる。隣り合っていない原子を介して接合された環は「架橋」環と呼ばれる。多環のそれぞれの環は、上記のような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、アシルアミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、アリールチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、一個のヘテロシクリル、一個の芳香族又はヘテロ環式芳香族の成分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、又は等々、で置換されてもよい。

#### ビタミンDの合成

本発明のビタミンD3化合物は、当業において公知の様々な合成法を用いて調製が可能である。例えば、上に説明した化合物の多くは、化学合成により調製したり、又は、 $3\beta$ -ビタミンD3前駆体の酵素による転化、例えばA環の3位置にあるヒドロキシ基を $\beta$ -配置に配向させたビタミンD3化合物である $313$ -ビタミンD3前駆体を、 $3\beta$ -ヒドロキシ基を $3\alpha$ 型ビタミンD3化合物にするエピマー化を触媒する酵素を含有する組織、例えば実施例I、II及びIVで説明するようなケラチノサイト又は骨細胞など、で灌流させて調製することが可能である。

例えば、式I及びIIのビタミンD3化合物を合成する方法は当業において公知である（例えばBouillon, R. et al., *Endocrine Reviews* 16 (2):201-204; Ikekawa N. (1987) *Med. Res. Rev.* 7:333-366; DeLuca H. F. and Ostrem V. K. (1988) *Prog. Clin. Biol. Res.* 259:41-55; Ikekawa N. and Ishizuka S. (1992) CRC Press 8:293-316; Calverley M. J. and Jones G. (1992) Academic Press 193-270; Pardo R. and Santelli M. (1985) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 98-114; Bythgoe B. (1980) *Chem. Soc. Rev.* 4 49-475; Quinkert G. (1985) *Synform* 3:41-122; Quinkert G. (1986) *Synform* 4:131-256; Quinkert G. (1987) *Synform* 5:1-85; Mathieu C. et al. (1994) *Diabetologia* 37:552-558; Dai H. and Posner G. H. (1994) *Synthesis* 138 3-1398を参照されたい）。合成法の例には、公知の態様 (Barton D. H. R. et al. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95:2748-2749; Barton D. H. R. (1974) *JCS Chem.*

Comm. 203-204) で容易に加熱分解してビタミンD<sub>3</sub>になるプレビタミンが最初に生成される、7-デヒドロコレステロールの1-ヒドロキシル化側鎖修飾誘導体の光化学開環法、Baggiolini E. G. et al. (1986) J. Org. Chem. 51:3098-3108; DeSchrijver J. and DeClercq P. J. (1993) Tetrahed Lett 34:4369-4372; Posner G. H and Kinter C. M. (1990) J. Org. Chem. 55:3967-3969が説いたように、酸化ホスフィンをグランドマンズ (原語: Grundmann's) ケトン誘導体にカップリングして1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 骨格を直接生成させる方法を含む、(Lythgoe et al (1978) JCS Perkin Trans. 1:590-595) により開発された酸化ホスフィンカップリング法; Harrison R. G. et al. (1974) JCS Perkin Trans. 1:2654-2657; Castedo L. et al. (1988) Tetrahed Lett 29:1203-1206; Mascarenas J. S. (1991) Tetrahedron 47:3485-3498; Barrack S. A. et al. (1988) J. Org. Chem. 53:1790-1796) and Okamura W. H. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:4072-4083が説くように、ジエニンに半水素添加を行なってプレビタミン構造にし、これを転位させて対応するビタミンD<sub>3</sub>類似体にする方法、複数の中間体を、熱を用いるか、又は、金属触媒異性化及びこれに続く高感度光異性化の組合せを用いて集成させるビニルアレン法 (Okamura W. H. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:4072-4083; Van Alstyne E. M. et al. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116:6207-6210)、非環式のA環前駆体をプロモエニンに分子内架橋結合させることによる1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>骨格の直接形成を含むTrost et al. B. M. et al. J. Am. Chem. Soc. 114:9836-9845; Nagasawa K. et al. (1991) Tetrahed Lett 32:4937-4940が説いた方法、トシル化誘導体を異性化してステロイドにし、これを炭素-1で修飾し、次にソボリティック (原語: sovolytic) 条件下で逆異性化して1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>又はその類似体を形成する方法 (Sheves M. and Mazur Y. (1974) J. Am. Chem. Soc. 97:6249-6250; Paaren H. E. et al. (1980) J. Org. Chem. 45:3253-3258; Kabat M. et al. (1991) Tetrahed Lett 32:2343-2346; Wilson S. R. et al. (1991) Tetrahed Lett 32:2339-2342)、ビタミンD誘導体を直接修飾して1-酸素化5,6-transビタミンDを (Andrews D. R. et al. (1986) J. Org. Chem. 51:1635-1637) が説いたように形成する方法、プレビタミンD<sub>3</sub>のディールス・アルダー環付加法を用い、熱異性化を介してプレビタミン型の中間体を通じてシクロリバート (原語: cyclorevert) して1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>にすることがで

きる方

法 (Vanmaele L. et al. (1985) Tetrahedron 41:141-144)、そして最後の、遷移金属誘導体などの適した保護基を用いるか、又はその他の化成により  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_2$  又は類似体の直接の修飾を含む方法 (Okamura W. H. et al. (1992) J. Cell Biochem. 49:10-18) がある。ビタミンD<sub>2</sub>化合物を合成するその他の方法は、例えば日本特許公報62750173号、26858/76号、26859/76号、及び71456/77号、米国特許第3,639,596号、第3,715,374号、第3,847,955号及び第3,739,001号に説かれている。

飽和した側鎖を有する本発明の化合物の例は、その記載を参考としてここに編入することとする米国特許第4,927,815号に示されかつ説明された概略的プロセスに基づいて調製することができる。不飽和の側鎖を有する本発明の化合物の例は、その記載を参考としてここに編入することとする米国特許第4,847,012号に示されかつ説明された概略的プロセスに基づいて調製することができる。R基が一緒になってシクロペンタノ基を表す本発明の化合物の例は、その記載を参考としてここに編入することとする米国特許第4,851,401号に示されかつ説明された概略的プロセスに基づいて調製することができる。

$1\alpha, 25$ -ジヒドロキシエルゴカルシフェロールの側鎖修飾された類似体を調製する合成戦略は他にも、Kutner et al., The Journal of Organic Chemistry, 1988, 53:3450-3457に開示されている。加えて、 $24$ -ホモ及び $26$ -ホモビタミンD類似体の調製は、その記載を参考としてここに編入することとする米国特許第4,717,721号に開示されている。

キラル分子のエナンチオ選択合成法は今や通常の技術である。エナンチオ選択合成及び精製技術を組み合わせて用いれば、数多くのキラル分子をエナンチオマ一的に濃縮された製剤として合成することができる。例えば、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のA環ジアステレオマーのエナンチオ選択合成法は、Muralidharan et al. (1993) J. Organic Chem. 58 (7):1895-1899及びNorman et al. (1993) J. Biol. Chem. 268 (27):20022-30のようにいくつかの方法が報告されている。当業において公知の様々な化合物のエナンチオマ合成法は他にも、とりわけ、エポキシド (例えばJohnson, R

. A., Sharpless, K. B. In *Catalytic Asymmetric Synthesis*; Ojima, I., Ed.: VCH: New York, 1993; Chapter 4. 1. Jacobsen, E. N. Ibid. Chapter 4. 2を参照されたい)、ジオール (例えばSharplessの方法による、J. Org. Chem. (1992) 57:2768)、及びアルコール (例えば

ケトンの還元による、E. J. Corey et al., J. Am. Chem. Soc. (1987) 109:5551) がある。光学的に濃縮された生成物を生成するのに有用なその他の反応には、オレフィンの水素添加 (例えばM. Kitamura et al., J. Org. Chem. (1988) 53:708)、ディールス-アルダー反応 (例えばK. Narasaka et al., J. Am. Chem. Soc. (1989) 111:5340)、エノラートのアルドール反応及びアルキル化 (例えばD. A. Evans et al., J. Am. Chem. Soc. (1981) 103:2127; D. A. Evans et al., J. Am. Chem. Soc. (1982) 104:1737を参照されたい)、カルボニル添加 (例えばR. Noyori, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. (1991) 30:49)、及びメソ-エポキシドの開環 (例えばMartinez, L. E.; Leighton, J. L.; Carsten, D. H.; Jacobsen, E. N. J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:5897-5898) がある。酵素を用いて光学的に濃縮された生成物を生成する方法も当業において公知である (例えばM. P. Schejder, ed. "Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis"; D. Reidel, Dordrecht (1986))。

キラル合成により、立体異性体の純度の高い生成物を得ることができる。しかしながら、場合によっては、生成物の立体異性体純度が十分に高くないこともある。当業者であれば、ここで説明された分離法を用いれば、キラル合成により得られたビタミンD3-エピマーの立体異性体純度をさらに高めることができることは理解されよう。

異性体の分離は当業において公知のいくつかの方法で達成することができる。一例として、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の天然又は合成ジアステレオマーを分離するのに用いられる直相及び逆相HPLC系を添付の実施例に詳述すると共に図2に示す。二つのエナンチオマーのラセミ体混合物を分離する方法には他にも、キラル固定相を用いたクロマトグラフィ (例えば"Chiral Liquid Chromatography", W. J. Lough, Ed. Chapman及びHall, New York (1989) を参照されたい) がある。エナンチオマーはさらに伝統的な分離技術を用いても分離が可能である。例えば、ジアステレオ

マーの塩の形成及び分別結晶を用いれば、エナンチオマーを分離することができる。カルボン酸のエナンチオマーの分離には、ジアステレオマーの塩をブルシン、キニーネ、エフェドリン、ストリキニーネ、等々のエナンチオマー的に純粋なキラル塩基を加えることで形成することができる。あるいは、ジアステレオマーのエステルを、メントールなどのエナンチオマー的に純粋なキラルアルコールで形成した後にジアステレオマーエステルの分離し、加水分解して、遊離した、エナンチオマー的に濃縮されたカルボン酸を得ることができる。アミノ化合物の光学異性体の分離には、樟脳スルホン酸、酒石酸、マンデル酸、又は乳酸などのキラルカルボン酸又はキラルスルホン酸を加えると、ジアステレオマーの塩を形成することができる。

#### 薬学的組成

別の態様では、本発明は、一つ又はそれ以上の薬学的に容認可能な担体と共に調製された、式I及びIIの単離されたビタミンD3化合物のうちの一つ又はそれ以上の治療上有効量を含む薬学的に容認可能な組成を提供するものである。

ある好適な実施例では、これらの薬学的組成は被験体に局所または経口投与するのに適切である。別の実施例では、以下に詳述するように、以下、(1)例えば飲薬(水溶液又は非水溶液又は懸濁液)、錠剤、巨丸剤、粉末、顆粒、パスタなどの経口投与、(2)例えば無菌溶液又は懸濁液などとして皮下、筋肉内又は静脈内注射するなどによる非経口投与、(3)例えば皮膚に施すクリーム、軟膏又はスプレーとした局所投与、(4)例えばペッサリー、クリーム又は泡などとした腔内又は直腸内、又は(5)当該化合物を含有する水性のエーロゾルなどのエーロゾル、リポソーム製剤又は固体粒子、に適合されたものを含め、本発明の薬学的組成を固体又は液体型での投与に向けて特に調製してもよい。

いくつかの実施例では、被験体は哺乳類、例えば霊長類、例えばヒトである。ここで用いられる場合の「被験体」という言語はヒト及びヒト以外の動物を含むものとして意図されている。好適なヒトの動物には、ビタミンD3応答性細胞の異常な活性を特徴とする異常を有するヒトの患者が含まれる。本発明において「ヒト以外の動物」という術語には、あらゆる脊椎動物、例えば哺乳類及び非哺乳

類、例えばヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、等々が含まれる。

ここで用いられる「治療上有効量」という文言は、式I及びIIのビタミンD3化合物の、又は、このような化合物を含む組成の、その化合物が例えばビタミンD3応答性細胞の活性を調節するなどの意図された機能を果たすのに効果的な量を意味する。有効量は、治療又は阻害しようとする細胞成長の種類、その特定のビタミンD3化合物の種類、被験体の大きさ、又は望ましくない細胞成長又は活性の重篤度などの因子によって異なる場合がある。当業者であれば、不合理な実験を行わずとも、上述した因子を研究し、また式I及びIIのビタミンD3化合物の有効量に関する決定を行なうことができる。

いくつかの実施例では、式I及びIIで表されるようなビタミンD3化合物を一つ又はそれ以上、単独で、又は併用療法の一部として投与してよい。例えば、ビタミンD3化合物を、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗物質、核酸、内位添加剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アポトーシスを促進する薬剤、及び／又は、免疫応答を調節する薬剤などの一つ又はそれ以上の薬剤と併用投与してもよい。用いられるビタミンD3化合物の有効量を、用いられるその他の薬剤濃度に従って改変してもよい。

ケラチノサイト又は副甲状腺細胞を用いたin vitroアッセイ又はこれに同様のアッセイ（例えば選択される細胞の違い、例えば骨細胞、腸管細胞、新形成細胞など）を用いると、式I及びIIのビタミンD3化合物、又はそれらの組合せの有効量を決定することができる。当業者であれば、上記のin vitroアッセイ又は同様のアッセイで、組み合わせにおけるそれぞれ個々の化合物が使用される適量を選択されよう。細胞活性又は細胞増殖の変化を利用すれば、選択された量が化合物の特定の組合せにとって有効量であるかどうかを判定することができる。投与の計画もまた、何が有効量を成すかを左右する場合がある。下に詳述するように、式I及びIIのビタミンD3化合物を、その他の薬剤の投与前、同時、又は後に被験体に投与することも可能である。さらに、いくつかに分割された用量や、ずらし用量を毎日又は順番に投与しても、あるいは治療状況の緊急度から判明した場合

には用量を比例的に増加又は減少させてもよい。

「薬学的に容認可能な」という文言は、ここでは、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又はその他の問題又は合併症を起こすことなく、ヒト及び動物の組織に接触させて利用するのに適した、合理的な利点／リスク比に見合う、健全な医学的判断の範囲内にある式 I 及び II のビタミン D<sub>3</sub> 化合物、このような化合物を含む組成、及び／又は投薬形態を言うために用いられている。

ここで用いられる「薬学的に容認可能な担体」という文言は、当該化学物質を身体のある臓器又は一部から別の臓器又は一部へと運ぶ又は輸送することに関連する、例えば液体又は固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒又は封入剤など、薬学的に容認可能な材料、組成又は伝播体を意味する。各担体は、その調剤のその他の成分と適合性があり、かつ患者にとって有害でないという意味において「容認可能」でなくてはならない。薬学的に容認可能な担体として働くことのできる材料のいくつかの例には、(1) 乳糖、ブドウ糖、及びショ糖などの糖類、(2) コーンスターチ及びいもでんぷんなどのでんぷん類、(3) カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロースなどのセルロース及びその誘導体、(4) 粉末状トラガカント、(5) 麦芽、(6) ゼラチン、(7) タルク、(8) ココアバター及び座薬用ろうなどの賦形剤、(9) ピーナッツ油、綿実油、

紅花油、ごま油、オリーブ油、コーン油及び大豆油などの油脂類、(10) プロピレングリコールなどのグリコール、(11) グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなどのポリオール、(12) オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル、(13) 寒天、(14) 水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤、(15) アルギン酸、(16) 発熱源なしの水、(17) 等張生理食塩水、(18) リンガー液、(19) エチルアルコール、(20) リン酸緩衝液、及び(21) 薬学的調剤に用いられるその他の非毒性適合性物質、がある。

湿潤剤、乳化剤及び潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなど、や着色剤、剥離剤、コーティング剤、甘味料、着香料及び香



料、保存剤及び抗酸化剤も組成中であってよい。

薬学的に容認可能な抗酸化剤の例には、(1) 水溶性の抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、等々、(2) 油溶性抗酸化剤、例えばアスコルビンパルミテート、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファートコフェロール、等々、及び(3) 金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸、等々、がある。

本発明のビタミンD3化合物を含有する組成には、経口、鼻腔、局所(頬及び舌下を含む)、直腸、膺、エーロゾル、及び/又は非経口投与に適したものが含まれる。当該組成は便利なよう単位用量形態で提供されてもよく、また薬学において公知のいかなる方法で調製されてもよい。一回の用量を作製するのに担体材料と配合することのできる有効成分の量は治療しようとするホスト、特定の投与形態に応じて様々であろう。一回の用量を作製するのに担体材料と配合することのできる有効成分の量は、一般には治療効果を生む当該化合物の量となるであろう。一般には、100パーセントのうち、この量は約1パーセントから約99パーセントの有効成分、好ましくは約5パーセントから約70パーセント、最も好ましくは約10パーセントから約30パーセントの範囲になるであろう。

これらの組成を調製する方法は、式I及びIIのビタミンD3化合物を、担体、及び選択に応じて一つ又はそれ以上の付属成分に会合させるステップを含む。概略的には、当該製剤は、ビタミンD3化合物を液体の担体、又は微細に分割された固体の担体、あるいはその両方に均一かつ密接して会合させ、必要に応じて生成物を成形することにより作製される。

経口投与に適した本発明の組成は、カプセル、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ(多くの場合ショ糖及びアカシアゴム又はトラガカントといった香味を付けられた基剤を用いて)、粉末、顆粒、又は、水性又は非水性の液体の溶液又は懸濁液として、又は、水中油又は油中水乳濁液として、又はエリキシル又はシロップとして、又は香錠(例えばゼラチン及びグリセリンなどの不活性の基剤、又はシ

ヨ糖及びアカシアゴムなどを用いて) 及び／又は口内洗浄剤、等々の形状としてもよく、それぞれに式I及びIIのビタミンD3化合物が所定量、有効成分として含まれることとなる。化合物はさらに、巨丸剤、し剤、又はパスタとして投与されてもよい。

経口投与用の本発明の固体投薬形(カプセル、錠剤、丸剤、糖衣剤、粉末、顆粒、等々)においては、有効成分は一つ又はそれ以上の薬学的に容認可能な担体、例えばクエン酸ナトリウム又はリン酸2カルシウム、及び／又は、以下のもののうちのいずれかと混合される。即ち、(1) 充填剤又は増量剤、例えばでんぷん、乳糖、ショ糖、ブドウ糖、マンニトール、及び／又は珪酸、(2) 結着剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖及び／又はアカシアゴム、(3) 湿潤剤、例えばグリセロール、(4) 崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、イモ又はタピオカでんぷん、アルギン酸、特定の珪酸塩、及び炭酸ナトリウム、(5) 溶解遅延剤、例えばパラフィン、(6) 吸収加速剤、例えば第四アンモニウム化合物、(7) 界面活性剤、例えばアセチルアルコール及びグリセロールモノステアレート、(8) 吸収剤、例えばカオリン及びベントナイト・クレイ、(9) 潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びこれらの混合物、及び(10) 着色剤、である。カプセル、錠剤及び丸剤の場合、薬学的組成にはさらに緩衝剤が含まれてもよい。さらに同様の種類の固形の組成を、軟質及び硬質準点ゼラチンカプセルの充填剤として、例えばラクトース即ち乳糖や、高分子ポリエチレングリコール、等々などの賦形剤を用いて利用してもよい。

錠剤は、選択に応じて一つ又はそれ以上の付属成分と一緒に圧縮又は成形法により作製してもよい。圧縮錠剤は結着剤(例えばゼラチン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性の希釈剤、保存剤、崩壊剤(例えばでんぷんグリコール酸ナトリウム又は架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムなど)、界面活性剤又は分散剤などを

用いて作製してもよい。成形錠剤は、適した機械で、不活性の希釈剤で湿らせた

粉末状ペプチド又はペプチド擬態の混合物を成形することにより作製してもよい。

錠剤、又はその他の固体投薬形の本発明の薬学的組成、例えば糖衣錠、カプセル、丸剤及び顆粒剤は、選択に応じて刻み目を付けたり、又は腸溶コーティング及び製薬業で公知のその他のコーティングなどのコーティング又はシェルと一緒に調製してもよい。これらはさらに、例えば様々な比率でヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いることで所望の放出曲線、その他のポリマー・マトリックス、リポソーム及び／又は微小球を提供するなど、その中の有効成分の放出を遅延させる又は制御するように調製されてもよい。これらを、例えば細菌保持フィルタでろ過したり、又は無菌水に溶解可能な無菌の固形組成型の滅菌剤又はその他の何らかの注射可能な滅菌媒質を使用直前に組み込むなどして滅菌してもよい。これらの組成にはさらに選択に応じて乳白剤を含有させてもよく、さらにこれらが有効成分のみ、又は有効成分を優先的に、胃腸管内の特定の部分で選択に応じて遅効的態様で放出させるような組成としてもよい。利用可能な埋封組成の例にはポリマー物質及びろうがある。有効成分はさらに、適宜、一つ又はそれ以上の上述した賦形剤と一緒にマイクロカプセル型としてもよい。

本発明のビタミンD3化合物の経口投与用液体投薬形には、薬学的に容認可能な乳濁液、マイクロ乳濁液、溶液、懸濁液、シロップ及び賦形剤が含まれる。有効成分に加え、この液体投薬形には当業において通常用いられる不活性の希釈剤、例えば水又はその他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油脂（特に綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油及びごま油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、及びソルビタンの脂肪酸エステル、及びこれらの混合物など、を含めてもよい。

不活性の希釈剤の他にも、経口用の組成にはさらに、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、香味料、着色剤、香料及び保存剤などのアジュバントを含めることもできる。

懸濁液では、有効ビタミンD3化合物に加え、例えばエトキシ化イソステアリル

アルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天及びトラガカント、並びにこれらの混合物などの、懸濁剤を含めてもよい。

直腸及び膣投与用の本発明の薬学的組成は座薬として提供されてもよく、またこの座薬は、式I及びIIのビタミンD3化合物のうちの一つ又はそれ以上を、例えばココアバター、ポリエチレングリコール、座薬用ろう又はサリチル酸塩を含む一つ又はそれ以上の適した非刺激性賦形剤又は担体に組み合わせることで調製してもよいが、この賦形剤又は担体は室温では固体であるが体温では液体になり、従って直腸腔又は膣腔で溶解して有効成分を放出するようなものである。

膣投与に適した本発明の組成には、さらに、当業において適切であることが知られたものなどの担体を含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、パスタ、泡又はスプレー製剤が含まれる。

式I及びIIのビタミンD3化合物の局所又は経皮投与用投薬形には、粉末、スプレー、軟膏、パスタ、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤が含まれる。有効ビタミンD3化合物を、薬学的に容認可能な担体と、そして必要に応じて何らかの保存剤、緩衝剤、又は推進薬と、無菌条件下で混合してもよい。

軟膏、パスタ、クリーム及びゲルには、式I及びIIのビタミンD3化合物に加え、例えば動物及び植物性脂肪、油脂、ろう、パラフィン、でんぷん、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、珪酸、タルク及び酸化亜鉛、又はこれらの混合物などの賦形剤を含めてもよい。

粉末及びスプレーには、式I及びIIのビタミンD3化合物に加え、乳糖、タルク、珪酸、水酸化アルミニウム、珪酸カルシウム及び粉末ポリアミド、又はこれらの物質の混合物などの賦形剤を含めることができる。スプレーにはさらに、クロロフルオロ炭化水素や、ブタン及びプロパンなどの揮発性未置換炭化水素など、通常の推進薬を含めてもよい。

式I及びIIのビタミンD3化合物を、選択に応じてエアロゾルにより投与してもよい。これは、当該化合物を含有する水性のエアロゾル、リポソーム調剤又は固体粒子を調製することにより達成される。非水性の（例えばフルオロカーボンの

推進薬など)懸濁液も利用できるかも知れない。音波ネブライザは、化合物を劣化させる場合のあるせん断作用に薬剤が曝されることを抑えることができるため、好適である。

普通、水性のエロゾルは、当該薬剤の水溶液又は懸濁液を通常の薬学的に容認可能な担体及び安定化剤と一緒に調剤することにより作製される。この担体及び安定化剤は、特定の化合物の要件に応じて様々であるが、典型的には非イオン性界面活性剤(ツイーン、

プルロニック、又はポリエチレングリコール)、血清たんぱくなどの無害性のたんぱく質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシンなどのアミノ酸、緩衝剤、塩類、糖類又は糖アルコール類がこれに含まれる。エロゾルは一般には等張溶液から作製される。

経皮用パッチには、式I及びIIのビタミンD3化合物の身体への送達を制御できるという更なる利点がある。このような投薬形態は、当該薬剤を適した媒質に溶解又は分散させることにより作成することができる。さらに吸収促進剤を用いると、ペプチド擬態が皮膚を透過するフラックスを増加させることができる。このようなフラックスの率は、率制御膜を提供するか、又はポリマーマトリックス又はゲル中に当該ペプチド擬態を分散させることにより、制御することができる。

眼用製剤、眼用軟膏、粉末、溶液、等々もまた、本発明の範囲内にあるとして考察されている。

非経口投与用に適した本発明の薬学的組成には、式I及びIIのビタミンD3化合物の一つ又はそれ以上が、一つ又はそれ以上の薬学的に容認可能な無菌の等張性水溶液又は非水性溶液、分散液、懸濁液又は乳濁液、あるいは無菌粉末と組み合わせられて含まれ、前記の無菌粉末は、使用直前に無菌の注射可能な溶液又は分散液に再構築してもよく、前記の無菌の注射可能な溶液又は分散液には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤や、当該製剤をレシピエントの血液に等張にする溶質、又は懸濁剤又は増粘剤を含めてもよい。

本発明の薬学的組成中に利用してもよい適した水性又は非水性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポ

リエチレングリコール、等々）、及びこれらの適した混合物、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルがある。適した流動性は、例えばレシチンなどのコーティング材料を使用したり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を使用するなどすれば維持することができる。

これらの組成にはさらに、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントを含めてもよい。微生物の活動を防止するには、様々な抗菌剤及び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸、等々などを含めて確実にしてもよい。さらに、糖類、塩化ナトリウム、等々などの等張剤を組成中に含めることが好ましい。加え

て、注射可能な型の薬剤の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を含めることで達成してもよい。

場合によっては、薬剤効果を長引かせるべく、皮下又は筋肉内注射からの薬品の吸収を遅くすることが好ましい場合もある。これは、水溶性の乏しい結晶質又は非晶質物質の液体懸濁液を利用することで達成してもよい。こうして薬品の吸収速度は、結晶の大きさ及び結晶質型によってさまざまであろう溶解速度に左右されることとなる。あるいは、非経口投与される薬品型の吸収の遅延を、薬品を油脂の伝播体中に溶解又は懸濁させることにより達成する。

注射可能なデポ型は、式I及びIIのビタミンD3化合物のマイクロ埋封マトリックスをポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中に形成することで作製される。薬品のポリマーに対する比率、及び使用した特定のポリマーの性質に応じて、薬品の放出速度を制御することができる。その他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）がある。デポ型注射可能な製剤はさらに、身体組織に適合性のあるリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬品を閉じ込めることで作製される。

本発明のビタミンD3化合物を薬剤としてヒト及び動物に投与する際には、それらはそれ自体として、又は薬学的に容認可能な担体と組み合わせて旧から99.5%（より好ましくは0.5から90%）の有効成分を含有する薬学的組成として投与す

ることができる。

「投与」という術語には、式Iの3-エピマービタミンD3化合物を、それらに意図された機能を行なわせるべく被験体に導入する経路が含まれるものとして意図されている。利用可能な投与経路の例には、注射（皮下、静脈内、腸管外、腹腔内、鞘内、等々）、経口、吸入、直腸及び経皮が含まれる。もちろん、本薬学的製剤は各投与経路に適した型で投与される。例えばこれらの製剤は、注射、吸入、目薬、軟膏、座薬、等々により錠剤又はカプセル型として投与され、注射、輸注又は吸入による投与、ローション又は軟膏による局所投与、座薬による直腸投与である。経口投与が好ましい。注射は大量注射でも又は継続的な輸注でもよい。投与経路に応じて、式I及びIIのビタミンD3化合物を選択された材料で被膜又は同材料中に配置して、意図された機能を果たす能力に悪影響が及ぼされないよう、天然条件からそれを保護することができる。式I及びIIのビタミンD3化合物は単独で投与されても、又は上記のその他の薬剤、又は薬学的に容認可能な担体、あるいはその両方と組み合わせて投与されてもよい。本ビタミンD3化合物を、その他の薬剤を投与する前、

同薬剤と同時、又は同薬剤の投与後に投与してもよい。さらに、式I及びIIのビタミンD3化合物を、その活性の代謝産物又はより活性の代謝産物に*in vivo*で転化されるプロ型で投与することも可能である。

ここで用いられる場合の「非経口投与」及び「非経口的に投与する」という文言は、多くの場合注射による、腸内及び局所投与以外の投与形態を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髓内及び胸骨内注射及び輸注が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ここで用いられる「全身投与」、「全身的に投与する」、「末梢投与」及び「末梢的に投与する」という文言は、式I及びIIのビタミンD3化合物を、それが患者の身体に進入し、ひいては代謝及びその他の同様のプロセスに遭うように、例えば皮下投与などで投与することを意味する。

式I及びIIのこれらのビタミンD3化合物は、被験体、例えば哺乳類、例えばヒ

ト及びその他の動物に投与してもよい。投与は、経口、スプレーなどによる鼻腔、直腸的、腔内、非経口、槽内及び局所的に、例えば粉末、軟膏又は頬及び舌下を含めたドロップとしてなどを含め、いかなる適した投与経路で行なってもよい。

選択された投与経路に関係なく、適した水和型で用いてもよい式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物、及び／又は、本発明の薬学的組成は、薬学的に容認可能な投薬型に、当業者に公知の通常の方法により調剤される。

本発明の薬学的組成中の有効成分の実際の投薬量、及び投与の時間的経過は、患者に毒性をもたらすことなく特定の患者、組成、及び投与形態にとって所望の治療反応を達成するのに効果的な量の有効成分が得られるよう、変更してもよい。投薬量の範囲の例は一日当たり0.1から10 $\mu$ gである。

#### 本発明のビタミンD化合物の利用

本発明のもう一つの態様は、ビタミンD<sub>3</sub>の少なくとも一つの生活性を有すると共に、同じ条件下で被験体に投与したときにビタミンD<sub>3</sub>よりも優れた生物学的性質を有する、式I及びIIの単離されたビタミンD<sub>3</sub>化合物と、例えばとりわけ新形成細胞、増殖過多性皮膚細胞、

副甲状腺細胞、免疫細胞及び骨細胞など、ビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞の異常な活性が関与する異常を治療するためにこれらの化合物をテスト及び利用する方法とに関する。

ビタミンD<sub>3</sub>の「生活性」という言語には、応答性細胞において式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>が誘起するあらゆる活性が含まれるものとして意図されている。この術語には、これらの化合物の誘起するゲノム活性及び非ゲノム活性が含まれる (Bouillon, R. et al. (1995) Endocrinology Reviews 16 (2) :206-207; Norman A. W. et al. (1992) J. Steroid Biochem Mol. Biol. 41:231-240; Bar及びT. et al. (1991) J. Bone Miner Res. 6:1269-1275; Caffrey J. M. and Farach-Carson M. C. (1989) J. Biol. Chem. 264:20265-20274; Nemere I. et al. (1984) Endocrinology 115:1476-1483)。

ここで用いられる「ビタミンD<sub>3</sub>応答性細胞」という術語には、式I又はIIを有するビタミンD<sub>3</sub>化合物に応答することができると共に、増殖過多性皮膚細胞、副



甲状腺細胞、新形成細胞、免疫細胞、及び骨細胞の異常な活性が関与する異常に関連した、あらゆる細胞が含まれる。これらの細胞は、ビタミンD<sub>3</sub>活性化に、ゲノムの及び／又は非ゲノムの応答を始動させることで応答することができ、こうして最終的には細胞増殖、分化、生存、及び／又は、ホルモン分泌などのその他の細胞活性の調節が行なわれる。ある好適な実施例では、細胞の最終的応答は細胞増殖の阻害、及び／又は、分化特異遺伝子の誘導である。ビタミンD応答性細胞の例には、とりわけ免疫細胞、骨細胞、ニューロン細胞、内分泌細胞、新形成細胞、表皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞がある。

ここで用いられる「ビタミンD<sub>3</sub>アゴニスト」という言語は、応答性細胞においてビタミンD<sub>3</sub>の生活性を増強する、誘導する又は高める化合物を言う。いくつかの実施例では、アゴニストは、例えばビタミンD<sub>3</sub>核レセプタによる転写を活性化などのゲノム活性、又は、カルシウムチャンネル活動の増強を行なうなどの非ゲノムのビタミンD<sub>3</sub>活性を誘導するものかも知れない。その他の実施例では、そのアゴニストで処置すると特定の生体応答を誘起するのに必要なビタミンD<sub>3</sub>化合物の濃度が低下するなど、当該アゴニストは別のビタミンD<sub>3</sub>化合物に対するレセプタの感受性を増強するものである。「ビタミンD<sub>3</sub>アンタゴニスト」という言語は、ビタミンD<sub>3</sub>化合物のあらゆる生活性に拮抗するような化合物を含むものとして意図されている。

「非ゲノムの」ビタミンD活性という言語には、応答性細胞においてビタミンD<sub>3</sub>化合物が誘起する細胞活性（例えば組織を通じたカルシウム輸送）及び細胞レベル下活性（例え

ば電圧ゲート式カルシウム・チャンネルの膜カルシウム輸送開放、細胞内第二メッセンジャの変化など）が含まれる。これらの活性を検出するための電気生理学的及び生化学的技術は当業において公知である。ある具体的な、よく研究された非ゲノム活性の一例は、「トランスカルタキア（原語：transcaltachia）」と呼ばれる、腸管カルシウム移動の急速なホルモン刺激である (Nemere I. et al. (1984) Endocrinology 115:1476-1483; Lieberherr M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:20403-20406; Wali R. K. et al. (1992) Endocrinology 131:1125-1133; Wali R. K. et

al. (1992) Am. J. Physiol. 262: G945-G953; Wali R. K. et al. (1990) J. Clin. Invest. 85: 1296-1303; Bolt M. J. G. et al. (1993) Biochem. J. 292: 271-276)。実験上のトランスカルタキア (原語 transcalcitachia) の詳細な説明は、Norman, A. W. (1993) Endocrinology 133: 2002-2003; Yoshimoto, Y. 及び Norman, A. W. (1986) Endocrinology 118: 2300-2304 に提供されている。カルシウム活性及び第二メッセンジャー系での変化は当業において公知であり、その記載を参考としてここに編入することとする Bouillon, R. et al. (1995) Endocrinology Review 16 (2): 200-257 に広範に評価されている。

非ゲノムの活性をテストするためのシステム及びアッセイの例は、以下の参考文献に広範に説かれている。即ち、肝臓は (Baran D. T. et al. (1989) FEBS Lett 259: 205-208; Baran D. T. et al. (1990) J. Bone Miner. Res. 5: 517-524 に、ラットの骨芽細胞で、例えば ROS 17/2.8 細胞について (Baran D. T. et al. (1991) J. Bone Miner. Res. 6: 1269-1275; Caffrey J. M. (1989) J. Biol. Chem. 264: 20265-20274; Civitelli R. et al. (1990) Endocrinology 127: 2253-2262) に、筋肉は (DeBoland A. R. and Boland R. L. (1993) Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 117: 993-1004; Morelli S. et al. (1993) Biochem. J. 289: 675-679, Selles J. 及び Boland R. L. (1991) Mol. Cell. Endocrinol. 82: 229-235) に、及び副甲状腺細胞は (Bourdcau A. et al. (1990) Endocrinology 127: 2738-2743) である。

ビタミン D<sub>3</sub> の「ゲノムの」活性又は効果という言葉は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  のための核内細胞質ゾルレセプタ (VD3R) 伝達するような活性、例えば標的遺伝子の転写活性化など、を含むものとして意図されている。「VD3Rs」という術語は、リガンドの不在下でビタミン D 応答配列 (VDRE) を通じて結合トランス活性化する (Damm et al. (1989) Nature 339: 593-597; Sap et al. Nature 343: 177-180) ことのできる、タイプ II クラスのステロイド/甲状腺スーパーファミリー・レセプタのメンバー (Stunnenberg, H. G. (1993) Bio Essays 15 (5) 309-315) を含むものとして意図されている。ここで用いられる「VDREs」とは、直列反復型配列に並んだ半分の部位

から成る DNA 配列を言う。当業においては、タイプ II 型レセプタはそれらの各々

の結合部位にホモ二量体として結合せず、副次的な因子であるRXR (例えばRXR $\alpha$ 、RXR $\gamma$ ) を高親和性結合のために必要とすることが知られているYu et al. (1991) Cell 67:1251-1266; Bugge et al. (1992) EMBO J. 11:1409-1418; Kliewer et al. (1992) Nature 355:446-449; Leland et al. (1992) EMBO J 11:1419-1435; Zhang et al. (1992) Nature 355:441-446)。

結合に続き、標的遺伝子 (即ちこの特異的DNA配列に関連した遺伝子) の転写活性が、このレセプタヘテロ二量体に結合したリガンドの働きで促進される。ビタミンD3応答性遺伝子の例には、オステオカルシン、オステオポンチン、カルビンジン、副甲状腺ホルモン (PTH)、24-ヒドロキシラーゼ、及び $\alpha_v\beta_3$ -インテグリンがある。ビタミンD3化合物により誘起されるゲノム活性は、VD3Rsを含有する細胞でビタミンD3応答性遺伝子の転写の上方調節を検出することにより、テストすることができる。例えば、安定した状態のレベルの応答性遺伝子mRNA又はたんぱく質、例えばカルビンジン遺伝子、オステオカルシン遺伝子などを *in vivo* 又は *in vitro* で検出してもよい。利用可能な適した細胞には、例えばとりわけケラチノサイト、副甲状腺細胞、MG-63細胞系などのあらゆるビタミンD3応答性細胞が含まれる。

本発明の更なる実施例に基づき、便利なスクリーニング法をVD3Rsを含有する細胞系で確立することができるが、同方法は、(i) VD3R依存性態様で発現するレポータ遺伝子を有するレポータ遺伝子コンストラクトを含むこれらの細胞の培養株を確立するステップと、(ii) これらの細胞を式 I 及びIIのビタミンD3化合物に接触させるステップと、及び (iii) 前記レポータ遺伝子の発現量を観察するステップとを含む。レポータ遺伝子の発現はVD3Rsたんぱくの転写活性を反映するものである。典型的には、前記のレポータ遺伝子コンストラクトには、VD3Rsに応答性の一つ又はそれ以上の転写調節要素、例えば当業において公知のVD3Rs応答性配列 (VDRE) など、に有効に連結したレポータ遺伝子が含まれるであろう。このレポータ遺伝子からの転写量は、当業において適切であることが知られたいかなる方法を用いて測定してもよい。例えば、特異的mRNA発現をノーザン・ブロット法で検出しても、又は特異たんぱく生成物を特徴的な染色、免疫アッセイ又は固有活性により同定してもよい。好適な実施例では、当該レポータの遺伝子産物を

、その産物に関連した固有活性により検出する。例えば、レポータ遺伝子は、色彩、蛍光又は発光に基づく検出シグナルを酵素活性により生ずるような遺伝子産物をコードするものとしてもよい。こうして、

このレポータ遺伝子からの発現量を、テスト化合物不在下の同じ細胞での発現量に比較するか、又はこの特異的レセプタのない概ね同一の細胞での転写量に比較してもよい。その後、アゴニストであるビタミンD<sub>3</sub>化合物を、トランスフェクトしていない対照に比較したこれらのレポータ遺伝子の活性増加又は濃度増加により容易に検出することができる。

特定のテスト化合物をビタミンD<sub>3</sub>化合物の潜在的アゴニスト又はアンタゴニストとして同定すると、当該アッセイの実施者は引き続き、*in vitro*及び*in vivo*の両方でのその選択された化合物の効験及び特異性をテストすることであろう。その後*in vivo*でテストするにしても、又は、認可された薬品として動物に投与するにしても、当該アッセイで同定された薬剤は、動物、好ましくはヒトへの*in vivo*投与に向けて、上述したものなどの薬学的製剤に調製することができる。

ここで説明するように、本発明のビタミンD<sub>3</sub>化合物はビタミンD<sub>3</sub>よりも優れた生物学的性質を呈する。ここで用いられる場合の「優れた生物学的性質」という言語は、その効果を*in vivo*で高めるような、式I又はIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物に内在するあらゆる活性を言う。ある好適な実施例では、この術語は、*in vivo*での安定性がより高い、及び／又は、高カルシウム血症につながる活性がより低いなど、毒性がより低い、といった、ビタミンD<sub>3</sub>化合物の優れた性質上又は量的な治療特性を言うものである。この優れた生物学的性質は組織特異的態様及び非特異的態様の両方で起きるものかも知れない。例えば、いくつかの組織は、ビタミンD<sub>3</sub>を代謝して、組織特異的態様でこの化合物の生活性を促進するような固有の代謝産物にすることができるかも知れない。

式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物のより高い安定性は、組織インキュベーション研究で実証することができるが、この研究は、*in vivo*又は*in vitro*での長時間のインキュベート後に、ビタミンD<sub>3</sub>に比較してこのようなビタミンD<sub>3</sub>がより高い濃度であること、又は、血漿ビタミンD結合たんぱく（DBP）への結合が増加し

ていることは、安定性が高められた化合物であることを示唆したものである (A. W. Norman et al. J. Biol. Chem. 268 (27) :20022-20030を参照されたい)。

「低減された毒性」という言語は、in vivoで投与されたときに、例えば高カルシウム血症を起こす活性が低下しているなど、式I又はIIのビタミンD3化合物の誘起する望ましくないあらゆる副作用が低減されていることを含むものとして意図されている。「高カルシウム血症」又は「高カルシウム血症を起こす活性」という言語は、それに受け入れられてい

る臨床上的意味、即ち以下、中枢及び末梢神経系の低下、筋肉の脆弱化、便秘、腹部痛、食欲不振、及び心臓拡張期の弛緩低下といった副作用となって被験体に顕われるカルシウムの血清レベルの増加、を有するものとして意図されている。高カルシウム血症の症状発現は、以下の活性、即ち腸管カルシウム輸送、骨カルシウム代謝及びオステオカルシン合成、のうちの少なくとも一つの刺激により始動される (Bouillon, R. et al. (1995) Endocrinology Reviews 16 (2) :200-257で評価)。

高カルシウム血症を起こす活性の低減を示す化合物は、当業において公知であると共にBouillon, R. et al. (1995) Endocrinology Reviews 16 (2) :200-257により評価された方法を用いてin vivo又はin vitroでテストすることができる。例えば、式I又はIIのビタミンD3化合物投与後の血清カルシウム量を通常の実験 (Lemire, J. M. (1994) Endocrinology 135 (6) :2818-2821) によりテストすることができる。簡単に説明すると、式I及びIIのビタミンD3化合物をビタミンDの欠乏した被験体、例えばげっ歯類、例えばマウス、又は鳥類の種、例えばニワトリ、などに筋肉内投与してもよい。適切な時間後に血清カルシウムレベル及びカルシウム摂取率の程度を用いて、テストされたビタミンD3化合物により誘起された骨カルシウム移動 (BCM) 及び腸管カルシウム吸収 (ICA) のレベルを、Norman, AW. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268 (27) :20022-20029に説かれたように判定することができる。加えても血清中のカルシウム濃度が増加しない、従ってそれらの異性体に比べてBCM及びICA応答が低いことを示すような化合物は、高カルシウム血症を起こす活性が低減されていると考えられる。カルシウム・ホメオスタシスに関連したア

ッセイについては他にも、下のカルシウム及びリン酸のホメオスタシスの項で説明することとする。

### 増殖過多状態

本発明の別の態様では、被験体においてビタミンD応答性細胞の異常な活性を特徴とする異常を治療する方法が提供される。本方法は、被験体に対し、前記細胞の活性が調節されるよう、式I又はIIのビタミンD3化合物の薬学的組成を有効量投与するステップを含む。ここで用いられる「調節する」という言語は、所望の最終結果が得られるよう、例えば治療上の結果が得られるよう、例えば動物の細胞のうちで少なくとも小集団の増殖が阻害される、及び／又は、分化が誘導されるなど、本発明の化合物への暴露に応答してある細胞の活性が増加又は減少することを言う。好適な実施例では、この文言は、病理学的異常に結び付く亢進的状态を含むものとして意図されている。

いくつかの実施例では、治療の対象となる細胞は増殖過多性細胞である。以下にさらに詳述するように、式I及びIIのビタミンD3化合物を用いると、様々な過形成性及び新形成性組織の増殖を阻害することができる。本発明に基づくと、式I及びIIのビタミンD3化合物を、例えばカルシノーマ、サルコーマ及び白血病など、増殖過多性の皮膚細胞、免疫細胞、及び形質転換した細胞を有する組織など、ビタミンD3応答性細胞の望ましくない成長を特徴とする病的及び非病的増殖状態の両方の治療に利用することができる。別の実施例では、治療の対象となる細胞は副甲状腺細胞、免疫細胞などの異常な分泌細胞である。

ここで用いられる場合の「増殖過多性」及び「新形成性」という術語は互換可能に用いられており、自律的成長の能力を有する、即ち急速に増殖する細胞成長を特徴とする異常な状況又は状態の細胞がこれに含まれる。増殖過多性及び新形成性の疾患状態は病的、即ち、疾患状態を特徴付けている又は構成している、と分類されたり、又は非病的状態、即ち正常からは逸脱しているが疾患状態とは関連していない、と分類されたりすることがある。この術語は、組織病理学的な種類又は浸潤段階に関係なく、あらゆる種類の癌性成長または腫瘍性プロセス、転移性組織又は悪性の形質転換をした細胞、組織、又は臓器を含むよう意図されて

いる。「病的増殖過多性」細胞は悪性の腫瘍成長を特徴とする疾患状態で発生する。非病的増殖過多性細胞の例には、外傷の修復に関連した細胞の増殖がある。

増殖過多的状態を治療する上での式I及びIIのビタミンD3化合物の利用には、それらが高カルシウム血症を起こす作用を持つために限界があった。従って、式I及びIIのビタミンD3化合物は現在の治療法に替わる、毒性のより低い方法を提供することができる。

一実施例では、本発明は、例えば表皮又は上皮細胞、例えばケラチノサイトなどの増殖過多性皮膚細胞を式I及びIIのビタミンD3化合物に接触させることにより、前記細胞の増殖を阻害する、及び／又は、分化を誘導する方法を特徴とするものである。概略的には、本方法は、病的又は非病的な増殖過多性細胞を有効量のこのようなビタミンD3化合物に接触させることで、この増殖過多性細胞の分化を促進するステップを含む。本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoの治療プロトコルの一部として行なってもよい。この治療計画はヒト又はいかなるその他の動物の被験体に対して行なわれてもよい。

本発明のビタミンD3化合物を増殖過多性皮膚異常を治療するために用いてもよい。異常の例には、乾癬、基底細胞癌、角質化異常及び角化症が含まれるが、これらに限らない。これらの異常の更なる例には、湿疹、狼瘡に関連する皮膚異常、乾癬性関節炎、関節包の内側の上皮関連細胞の増殖過多及び炎症を伴うリウマチ性関節炎、脂漏性皮膚炎及び日光皮膚炎などの皮膚炎、脂漏性角化症、老人性角化症、日光性角化症、光誘発性角化症、及び毛包性角化症などの角化症、尋常性座瘡、ケロイド及びケロイド形成に対する予防、母斑、いぼ、コンジローム及び尖圭コンジロームを含むいぼ、及び性病いぼなどのヒトパピロマウイルス (HPV) 感染症、ロイコプラキー、扁平苔癬、及び角膜炎がある。

一実施例では、式I及びIIのビタミンD3化合物を用いて、乾癬などの疾患においてケラチノサイトの増殖過多の阻害を、有効量のこれらの化合物を治療を必要とする被験体に投与することにより行なうことができる。「乾癬」という術語は、その医学上の意味、即ち、主に皮膚が罹患し、盛り上がった、肥厚した、はが

れを起こす非瘢痕性の病変を生む疾患を意味する。この病変は、通常、はっきりとした輪郭で周りから区別できる、つやのある鱗で覆われた紅斑性丘疹である。この鱗は典型的には銀色に輝いているか、又は僅かにたんぱく光を帯びている。爪に波及するとしばしば爪の点食、分離、肥厚及び変色が起きる。乾癬には時折関節炎が伴い、四肢の障害を起こす場合もある。ケラチノサイトの増殖過多が、表皮の炎症及びケラチノサイトの分化低下と共に乾癬性表皮過形成症の主たる特徴である。複数の機序が、乾癬を特徴付けるケラチノサイト増殖過多を説明するために取り上げられている。細胞免疫の異常も乾癬の病因に関連付けられている。

式I及びIIのビタミンD3化合物の薬学的組成を、皮膚の乾癬を治療するために局所的に、又は、経皮パッチにより送達又は投与してもよい。あるいは選択に応じて経口投与を利用する。さらに、本組成を、特に乾癬性関節炎などの関節炎の治療に、及び皮膚病変の直接注射のために、非経口的に送達してもよい。非経口治療は典型的には皮内、関節内、筋肉内又は静脈内である。本発明を実施する好適な方法は式I及びIIのビタミンD3化合物をクリーム又はオイルをベースにした担体に含有させて乾癬性の病変部に直接塗布する方法である。、典型的には、クリーム又はオイル中のビタミンD3化合物の濃度は1から2%である。選択に応じてエアロゾルを局所的に用いることも可能である。これらの化合物をさらに経口投与してもよい。

一般には、投与経路は局所（眼、頭皮、及び粘膜への投与を含む）、経口、又は非経口である。頭皮異常、角膜異常（角膜炎）、及び粘膜異常を含め、皮膚の異常の治療には、局所投与が、このような直接投与が可能であれば好適である。脂漏性皮膚炎及び頭皮の乾癬など、頭皮の異常の治療にはシャンプー製剤が場合によっては有利である。口内の異常及びロイコプラキーなど、粘膜の異常には口内洗剤及び経口用パスタ製剤が有利であるかも知れない。上述した皮膚の異常及びその他の異常の治療には、直接の局所投与が無理な場合には経口投与が好適であり、これはその他の投与にも好適な経路である。

一箇所又は数箇所（例えば2から6箇所）の関節を治療する場合には関節内注射



が好適な方法である。さらに、適した場合には治療用化合物を罹患部（罹患部内投与）に直接注射する。乾癬などの皮膚の異常には皮内投与が一つの方法である。

投与される薬学的組成の量は、とりわけ、患者の疾患の種類、疾患の重篤度、式I又はIIの活性ビタミンD3化合物の種類に応じて様々である。例えば、増殖過多性皮膚状態を治療するには、式I又はIIのビタミンD3化合物を、局所製剤1グラム当たり1から1000 $\mu$ gの範囲の用量で局所投与することができる。

### 新形成

もう一つの実施例は、ビタミンD3応答性増殖過多細胞を式I又はIIのビタミンD3化合物に接触させることにより、前記細胞の増殖を阻害する、及び／又は、その形質転換した表現型を反転させる方法の特徴とするものである。概略的には、本方法は、増殖過多細胞の分化を促進するために、病的又は非病的な増殖過多細胞を式I又はIIの有効量のビタミンD3化合物に接触させるステップを含む。本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoの治療プロトコルの一部として行なってもよい。この治療計画はヒト又はその他の動物の被験体に対して行なわれてもよい。

「抗新形成薬剤」及び「抗増殖薬剤」という術語はここでは互換可能に用いられており、このような性質、特に造血性新生物を有する新生物の発達又は進行を阻害するなど、ビタミンD3応答性細胞の増殖を阻害する機能的性質を有する薬剤がこれに含まれる。

ここで用いられる「治療上有効な抗新形成的量の」式I又はIIのビタミンD3化合物とは、一個の又は複数の用量を患者に投与したときに、新形成ビタミンD3応答性細胞の成長を阻害する上で、又は、このような新形成細胞を持つ患者の存命率を、このような治療の不在下で予測されるものを超えて延長する上で効果的であるような量の薬剤を言う。ここで用いられる新生物の「成長を阻害する」には、その成長及び転移を遅延させる、干渉する、中止させる又は停止させることが含まれ、必ずしも新形成成長の完全な消失を示すものではない。

ここで用いられる「予防上有効な抗新形成的量の」化合物とは、一個の又は複

数の用量を患者に投与したときに、新形成疾患状態の発症の発生を防止する又は遅延させる上で効果的な量の式I又はIIのビタミンD3化合物を言う。

「新形成」という術語の通常の医学的意味は、例えば新形成細胞の成長など、正常な成長制御に対する応答性を消失することになる「新しい細胞の成長」を言うものである。「過形成」とは、異常な高速度で成長を行なっている細胞を言う。しかしながら、ここで用いられる場合の新形成及び過形成という術語は、それらの文脈から分かるように互換可能に用いられている場合があり、大まかに言えば異常な細胞成長速度を体験している細胞を言うものである。新形成症及び過形成症には、良性、前癌又は悪性のいずれかである「腫瘍」が含まれる。

式I及びIIのビタミンD3化合物を、まず、新形成細胞の増殖をそれらが阻害する効果について*in vitro*でテストしてもよい。利用できる細胞株の例は、形質転換細胞、例えばヒト前骨髄白血病細胞株HL-60、及び、ヒト骨髄白血病U-937細胞株である(Abe E. et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4990-4994; Song L. N. and Cheng T. (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43:2292-2295; Zhou J. Y. et al. (1989) *Blood* 74:82-93, US. Pat. Nos. 5,401,733, US. 5,087,619)。あるいは、式I及びIIのビタミンD3化合物の抗腫瘍作用を、当業において公知であり、ここに参考として編入することとするBouillon R. et al. (1995) *Endocrine Reviews* 16(2):233 (表E) に要約された様々な動物モデルを用いて*in vivo*でテストしてもよい。例えば、M1骨髄白血病のモデルとしてSLマウスが通常、当業において式I及びIIのビタミンD3化合物をテストするために用いられている(Honma et al. (1983) *Cell Biol.* 80:201-204, Kasukabe T. et al. (1987) *Cancer Res.* 47:567-572)。乳がん研究は、例えばヒトMX1 (ER) のヌードマウスモデルで行なうことができ(Abe J. et al. (1991) *Endocrinology* 129:832-837;、その他の癌、例えば大腸癌、

黒色腫、骨肉腫など、は例えば(Eisman J. A. et al. (1987) *Cancer Res.* 47:21-25; Kawaura A. et al. (1990) *Cancer Lett.* 55:149-152; Belleli A. (1992) *Carcinogenesis* 13:2293-2298; Tsuchiya H. et al. (1993) *J. Orthopaed Res.* 11:122-130)に説かれたようなヌードマウスモデルで特徴付けることができる。

さらに本方法を、例えば骨髄系、リンパ球系又は赤血球系などから生まれるも

のなど、造血系起源又はそれらの前駆体細胞の過形成／新形成細胞の増殖を阻害するために用いてもよい。例えば本発明は、急性前骨髄白血病 (APML)、急性骨髄性白血病 (AML) 及び慢性骨髄性白血病 (CML) を含む、しかしこれに限らず、様々な骨髄性異常の治療を考察するものである (Vaickus, L. (1991) Crit Rev in Oncol / Hemotol. 11:267-97で評価)。本方法で治療可能と思われるリンパ球の悪性腫瘍には、B-系ALL及びT-系ALLを含む急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病 (PLL)、ヘアリーヤル白血病 (HLL) 及びワルデンストレーム大グロブリン血症 (WM) があるが、これらに限らない。本発明の治療法の考察するところである更なる形の悪性リンパ腫には、非ホジキンリンパ腫及びその様々な変異型、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫 (ATL)、皮膚T細胞リンパ腫 (CTCL)、大型顆粒リンパ球白血病 (LGF) 及びホジキン病があるが、これらに限定されるものではない。

「白血病」という術語は、その臨床上の意味、即ち小体成熟が細胞発達の初期の段階で停止する新形成疾患という意味を持つものとして意図されている。この疾患は、骨髄中の白血病芽細胞が増加していることと、正常な造血細胞産生が様々な程度で行えないことを特徴としている。この状態は急性であったり、又は慢性であったりする。多くの場合、白血病は更に、リンパ球性のもの、即ち正常なリンパ球と共通の性質を持つ細胞を特徴とするものか、又は骨髄球性（又は骨髄性）のもの、即ち正常な顆粒球細胞のいくつかの特徴を有する細胞を特徴とするもの、に分類されている。急性リンパ球白血病（「ALL」）はリンパ球組織で発生するが、通常その存在が最初に頭われるのは骨髄においてである。急性骨髄性白血病（「AML」）は骨髄造血幹細胞又はそれらの子孫から発生する。急性骨髄球性白血病という術語は白血病のいくつかの亜型、即ち骨髄芽性白血病、前骨髄球性白血病、及び骨髄性単核細胞白血病、を包含するものである。加えて、赤血球性又は巨核球性の性質を持つ白血病も骨髄性白血病とみなされる。

ここで用いられる場合の「白血病性癌」という術語は、造血系及び免疫系（血液及びリンパ系）のあらゆる癌又は新形成症を言う。急性及び慢性の白血病は、その他の種類の血液の腫瘍、骨髄細胞の腫瘍（ミエローマ）、及びリンパ組織の

腫瘍（リンパ腫）と共に、すべての癌死の約10%、そして小児及び30歳未満の成人のすべての癌死の約50%を起こしている。慢性顆粒球性白血病 (CGL) としても知られる慢性骨髄性白血病 (CML) は、造血幹細胞の新形成異常である。「白血病」という術語は当業において認識されており、血液及び骨髄における白血球及びそれらの前駆体の異常な増殖及び発達を兆候とする、血液形成器官の進行性、悪性疾患を言う。

いくつかの実施例では、式 I 及び II のビタミンD3化合物を従来の癌化学療法剤と組み合わせた併用療法に用いることができる。白血病及びその他の腫瘍のために従来からある治療計画には、放射線、薬品、又は両者の組み合わせがある。放射線に加え、以下の薬品が、多くの場合相互に組み合わせられて、急性白血病を治療するために用いられることがしばしばある。即ち、ビンクリスチン、プレドニゾン、メトトレキアート、メルカプトプリン、シクロフォスファミド、及びシタラビンである。慢性白血病では、例えばブスルファン、メルファラン、及びクロラムブシルを組み合わせる用いることができる。従来の抗がん剤はいずれも毒性が高く、治療中に患者の気分が大変悪くなる傾向がある。すべての白血病細胞が破壊されない限り、残りの細胞が増殖して再発が起きるという前提に基づいて精力的な治療が行なわれている。

本方法はさらに様々な臓器系の悪性腫瘍の治療に有用であると考えられ、このような悪性腫瘍には、例えば肺臓、乳房、リンパ系、胃腸管、及び尿生殖路に罹患するものや、大部分の大腸癌、腎細胞癌、前立腺癌及び／又は精巣癌、肺臓の非小細胞癌、小腸の癌、及び食道癌などの悪性腫瘍を含む腺癌がある。

「カルチノーマ」という術語は当業において認識されており、呼吸系のカルチノーマ、胃腸系のカルチノーマ、尿生殖系のカルチノーマ、精巣のカルチノーマ、乳房のカルチノーマ、前立腺のカルチノーマ、内分泌系のカルチノーマ、及びメラノーマを含む上皮及び内分泌組織の悪性腫瘍を言う。カルチノーマの例には、子宮頸部、肺臓、前立腺、乳房、頭部及び首、大腸及び子宮の組織から形成されるものが含まれる。この術語はさらに癌肉腫が含まれ、この癌肉腫には例えば、カルシノー

マ性及び肉腫性の組織から構成される悪性の腫瘍が含まれる。「アデノカルシノーマ」とは、腺組織を由来とするか、又は、腫瘍細胞が認識可能な腺状構造を形成するようなカルシノーマを言う。

「肉腫」という術語は当業において認識されており、間葉由来の悪性腫瘍を言う。

形質転換細胞の分化にビタミンD3が関与しているという一般的な典型に基づく、本発明の方法により治療することのできる固形の腫瘍の例には、ビタミンD3応答性表現型の肉腫及びカルチノーマ、例えば、しかしこれらに限らず、線維肉腫、粘膜肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユースイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、すい臓癌、乳がん、子宮癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、のう腺癌、髓様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆道癌、絨毛上皮癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、肺がん、小細胞肺がん、膀胱カルチノーマ、上皮カルチノーマ、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経腫、髓膜腫、黒色腫、神経芽腫、及び網膜芽腫などである。

式I又はIIのビタミンD3化合物の治療上有効な抗新形成的量、又は予防上有効な抗新形成的量の決定は、当業者である医師又は獣医（「担当医」）により、公知の技術を用い、また同じような状況で得られた結果を観察することで、容易に下すことができる。用量は担当医の判断する患者の要件、治療しようとする状態の重篤度、及び、利用する特定の化合物に応じて変更してもよい。治療上有効な抗新形成的量又は用量、及び、予防上有効な抗新形成的量又は用量を決定する際には、数多くの因子を担当医は考察することとなるが、そのような因子の中には、例えば、しかしこれらに限らず、関与する特定の過形成／新形成細胞、特定の薬剤及びその投与形態及び経路の薬学動態的特徴、治療の所望の時間的経過、当該哺乳類の種、その大きさ、年齢、及び全身の健康状態、関与する特定の疾患、その疾患の関与の程度又は重篤度、個々の患者の反応、投与される特定の化合物、投与形態、投与される製剤の生物学的利用能という特徴、選択された投薬計画

、併用療法の種類(即ち、式I及びIIの本ビタミンD3化合物の、その他の同時投与される治療薬との相互作用

用)、及びその他の関連する状況である。例えば米国特許第5,427,916号が、個々の患者での抗新形成治療の効果を予測する方法を説くと共に、本発明の治療プロトコルに関連させて用いることのできる方法をいくつか、その実例を挙げている。

治療は、本化合物の最適用量よりも少ない小用量で開始してもよい。その後、その状況下で最適な効果が得られるまで、この用量を次第に少しずつ漸増させていくべきである。便利なよう、所望に応じて一日当りの総用量を分割し、一日で数回に分けて投与してもよい。式I又はIIのビタミンD3化合物の治療上有効な抗新形成的量、及び、予防上有効な抗新形成的量は、一日当たり体重1キログラム当たり(mg/kg/日)0.1ミリグラムから、約100mg/kg/日であると予測される。

動物、例えばイヌ、げっ歯類など、において腫瘍の予防又は治療に有効であると判断された化合物は、さらにヒトの腫瘍の治療にも有用であるかもしれない。ヒトの腫瘍の治療に携わる当業者であれば、動物研究で得られたデータに基づき、ヒトへの当該化合物の用量及び投与経路を知るところであろう。一般には、ヒトでの用量及び投与経路は動物でのそれと同様であると予測される。

過形成／新形成疾患状態の予防的処置が必要である患者の判定は、充分に当業者の能力及び知見の範囲である。当該本法で治療可能な新形成疾患状態を発症する危険性のある患者を判定するための方法のいくつかが医学分野で解明されており、その中には例えば、特定の疾患状態発症の家族歴や、当該患者における、その疾患状態の発症に関連した危険因子の存在がある。本出願は、さらに、本発明の方法の利用に関する臨床上の予測を利用する、又は増強するのに用いることのできるその他の予後徴候テストを説明するものである。当業における臨床医であれば、例えば臨床検査、身体検査及び医学的／家族歴を利用することにより、このような患者候補を用意に判定することができる。

#### 免疫調節作用

別の態様では、本発明は、免疫細胞を式I又はIIのビタミンD3化合物に接触さ

せることにより、前記細胞の活性を調節する方法を提供するものである。ビタミンD3化合物は、その抗原特異的免疫系に及ぼす阻害作用が当業において公知である。ここで用いられる「免疫応答の阻害」という文言は、例えばIL2、インターフェロン- $\gamma$ 、GM-CSF合成及び分泌の

低下など、T細胞の増殖及び活性の低下 (Lemlie, J. M. (1992) J. Cell Biochemistry 49:26-31; Lemire, J. M. et al. (1994) Endocrinology 135 (6) :2813-2821; Bouillon, R. et al. (1995) Endocrine Review 16 (2) :231-32) を含むものとして意図されている。

ある一つの実施例では、本発明は、病的又は非病的な免疫細胞を有効量の式I又はIIのビタミンD3化合物に接触させて、当該治療の不在下にある細胞に比較して免疫応答を阻害することにより、免疫細胞の免疫活性を抑制する方法を提供するものである。本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoの治療プロトコルの一部として行なってもよい。in vivoでの治療はヒト、又はその他の動物の被験体に対して行なわれてもよい。

式I又はIIのビタミンD3化合物を、Reichel, H. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3385-3389; Lemire, J. M. et al. (1985) J. Immunol. 134:2032-2035に説かれているように、T細胞の増殖及び分泌活性に及ぼすそれらの阻害作用について最初にin vitroでテストしてもよい。あるいは、その免疫抑制作用を当業において公知であり、Bouillon, R. et al. (1995) Endocrine Reviews 16 (2) 232 (表6及び7) が要約したような様々な動物モデルを用いてin vivoでテストしてもよい。例えば、自己免疫異常、例えば狼瘡、甲状腺炎、脳炎、糖尿病及び腎炎など、の動物モデルが (とりわけLemire J. M. (1992) J. Cell Biochem. 49:26-31; Kolzumi T. et al. (1985) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 77:396-404; Abci J. et al. (1990) Calcium Regulation and Bone Metabolism 146-151; Fournier C. et al. (1990) Clin. Immunol Immunopathol. 54:53-63; Lemire J. M. and Archer D. C. (1991) J. Clin. Invest. 87:1103-1107; Lemire, J. M. et al., (1994) Endocrinology 135 (6) :2818-2821; Inaba M. et al. (1992) Metabolism 41:631-635; Mathieu C. et al. (1992) Diabetes

41:1491-1495; Mathieu C. et al. (1994) *Diabetologia* 37:552-558; Lillevang S. T. et al. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 88:301-306) に説かれている。例えば皮膚移植、心臓移植、小島移植などの臓器移植中の免疫抑制活性を特徴付けるモデルは、Jordan S. C. et al. (1988) v Herrath D (eds) *Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology* 346-347; Veyron P. et al. (1993) *Transplant Immunol.* 1:72-76; Jordan S. C. (1988) v Herrath D (eds) *Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology* 334-335; Lemire J. M. et al. (1992) *Transplantation* 54:762-763; Mathieu C. et al. (1994) *Transplant Proc.* 26:3128-3129) に説かれている。

特定のテスト化合物をin vitroで免疫応答の有効な抑制剤であると同定したら、これらの化合物をin vivoで治療プロトコルの一部として用いることができる。従って、もう一つの実施

例は、移植片拒絶反応、自己免疫異常、及び炎症などの免疫応答を阻害するために、式I又はIIのビタミンD3化合物の薬学的製剤を被験体に投与するステップを含む、免疫応答を抑制する方法を提供するものである。

例えば、式I及びIIのビタミンD3化合物を、T細胞応答を下方調節することが好ましいような臨床上の場面において応答を阻害するのに用いることができる。例えば、移植片対宿主反応による疾患、移植場面、自己免疫疾患(例えば糖尿病、関節炎(リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、変形性関節症、乾唐性関節炎を含む)、多発性硬化症、脳脊髄炎、糖尿病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎を含む)、乾癬、シェーグレン症候群に付随する乾性角結膜炎を含むシェーグレン症候群、円形脱毛症、節足動物咬傷反応が原因のアレルギー反応、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー喘息、皮膚紅斑性狼瘡、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい反転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、突発性両側性進行性感覚神経性聴力損失、再生不良性貧血、真正赤血球性貧血、突発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェグナー肉芽腫症、慢性進行性肝炎、スティーヴンズ-ジョンソン症候群、突発性スプルー、扁平苔瘡、クロ-



ン病、グレーブズ眼症、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後ブドウ膜炎、及び間質性肺線維症)である。免疫活性の下方調節はさらに、アトピー性アレルギーなどのアレルギーの場合にも望ましいであろう。

前に述べたように、治療上有効な免疫抑制量の決定は、当業者である担当医が、公知の技術を用い、かつ類似の状況で得られた結果を観察することにより、容易に行なうことができる。当業者であれば、イヌ、げっ歯類などの動物で有効と判断された化合物をヒトに応じて推定してもよい。動物で用いられる開始用量/計画は、それまでの研究に基づいて推定することができる。例えば、げっ歯類で自己免疫異常を治療するための式I及びIIのビタミンD3化合物の用量は、まず経口又は注射により投与される0.1g/kg/日から1g/kg/日の範囲で推定してもよい。当業者であれば、動物研究で得られたデータに基づき、ヒトでの用量及び投与経路が動物でのそれと同様であると予測できることは知るところであろう。ヒトで用いられる用量範囲の例は、成人一人当たり0.25から10  $\mu$ g/日、好ましくは0.5から5  $\mu$ g/日(米国特許第4,341,774号)である。

#### カルシウム及びリン酸のホメオスタシス

本発明はさらに被験体におけるカルシウム代謝の調節異常を特徴とする異常を治療する方法にも関するものである。本方法は、病的又は非病的なビタミンD3応答性細胞を、有効量の式I又はIIのビタミンD3化合物に接触させることにより、カルシウム及びリン酸のホメオスタシスを直接的又は間接的に調節するステップを含む。「ホメオスタシス」という術語は内部環境において静的、即ち一定の条件の維持を意味するものとして当業において認識されている。ここで用いられる場合の「カルシウム及びリン酸のホメオスタシス」という術語は、ある細胞、ある組織、ある臓器、又はある系においてカルシウム及びリン酸の濃度が変動することで始動される、細胞内及び細胞外のカルシウム濃度及びリン酸濃度の微妙なバランスを言う。式I及びIIのビタミンD3化合物に直接又は間接的に応答することで生ずるカルシウム量の変動はこれらの術語に含まれるものとして意図されている。in vivo又はin vitroでのカルシウム変動を検出する技術は当業において公知である。

$\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスに関連するアッセイの例には、腸管の $^{45}\text{Ca}^{2+}$  吸収を、1) *in vivo*で (Hibberd K. A. and Norman A. W. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18:2347-2355; Hurwitz S. et al. (1967) *J. Nutr.* 91:319-323; Bickle D. D. et al. (1984) *Endocrinology* 114:260-267)、又は2) *in vitro*で反転十二指腸で (Schachter D. et al. (1961) *Am. J. Physiol.* 200:1263-1271) 調べるという腸管に注目するアッセイや、あるいは、3) ヒヨコのカルビンジン- $\text{D}_{28}\text{k}$  のゲノム誘導、又はラットでのカルビンジン- $\text{D}_{9}\text{k}$  のゲノム誘導 (Thomasset M. et al. (1981) *FEBS Lett.* 127:13-16; Brehier A. and Thomasset M. (1990) *Endocrinology* 127:580-587) に注目するアッセイがある。骨に着目したアッセイには、1) ( $\text{Ca}^{2+}$  ゼロ食を与えた動物で) *in vivo*での骨からの $\text{Ca}^{2+}$  放出で判定した骨吸収の評価 (Hibberd K. A. and Norman A. W. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18:2347-2355; Hurwitz S. et al. (1967) *J. Nutr.* 91:319-323)、又は、*in vitro*での骨外植片からの $\text{Ca}^{2+}$  放出で判定した骨吸収の評価 (Bouillon R. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:3044-3051)、2) 血清オステオカルシン量の測定 [オステオカルシンは骨芽細胞-特異たんぱくであり、その合成後、大部分が骨基質に取り込まれるが、部分的には

血流 (又は組織培養媒質) に放出されるため、骨形成又は代謝回転の良好な市場である] (Bouillon R. et al. (1992) *Clin. Chem.* 38:2055-2060)、又は3) 骨灰含有量 (Norman A. W. 及び Wong R. G. (1972) *J. Nutr.* 102:1709-1718) の測定がある。腎臓に関連したアッセイは一つだけが利用されたことがある。このアッセイでは尿の $\text{Ca}^{2+}$  排泄が調べられる (Hartenbower D. L. et al. (1977) *Walter de Gruyter, Berlin* pp587-589) が、このアッセイは血清 $\text{Ca}^{2+}$  量の上昇に依存し、腎臓の作用よりも骨 $\text{Ca}^{2+}$  移動活性を反映する可能性がある。最後に、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  又は類似体の誘導する重篤な高カルシウム血症の結果を検出するのに用いられてきた「軟部組織石灰化」アッセイがある。このアッセイでは、ラットにある腹腔量の $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を投与した後、七日間毎日、比較的高用量の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  又は目的の類似体を投与する。重篤な高カルシウム血症が発症したときに、軟部組織石灰化をこの $^{45}\text{Ca}^{2+}$  量を判定することで評価することができる。これらのすべてのアッセイにおいて、ビタミンD3化合物又は式 I 及び II が、ビタミンD 充分な動物又

は欠乏動物に、単一の用量として又は間断なく（アッセイのプロトコルに応じて）、アッセイの終了点が定量されるまで適切な時間間隔で投与される。

いくつかの実施例では、式 I 及び II のビタミン D3 化合物を用いて骨代謝を調節することができる。「骨代謝」という言語は、骨形成、骨再吸収、等々、骨構造の形成又は変性における、最終的には血清中のカルシウム及びリン酸濃度を左右することのある直接又は間接的作用を含むものとして意図されている。この術語はさらに、骨形成及び変性につながるような、破骨細胞及び骨芽細胞などの骨細胞におけるビタミン D3 化合物の作用を含むものとして意図されている。例えば、当業においては式 I 及び II のビタミン D3 化合物は骨形成細胞、骨芽細胞に対し、ゲノム経路及び非ゲノム経路を通じて作用を及ぼすことが知られている (Walters M.R. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:7481-7484; Jurutka P.W. et al. (1993) Biochemistry 32:8184-8192; Mellon W.S. and DeLuca H.F. (1980) J. Biol. Chem. 255:4081-4086)。同様に、式 I 及び II のビタミン D3 化合物が、例えば単核細胞及び単核貪食細胞の破骨細胞への分化を刺激するなど、骨再吸収性破骨細胞の異なる活性を支援することが当業において知られている (Abe E. et al. (1988) J. Bone Miner. Res. 3:635-645; Takahashi N. et al. (1988) Endocrinology 123:1504-1510; Udagawa N. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7260-7264)。

従って、骨細胞の生成を調節する式 I 及び II のビタミン D3 化合物は骨形成及び変性に影響を与えることができるのである。

本発明は、病的又は非病的な骨細胞を有効量の式 I 又は II のビタミン D3 化合物に接触させることにより、骨形成及び変性を調節するといった、骨細胞代謝を調節する方法を提供するものである。本方法は、培養株中の細胞、例えば *in vitro* 又は *ex vivo* で行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えば *in vivo* で行なってもよい。利用可能な培養系の例には、とりわけ、骨芽細胞株、例えば ROS 17/2.8 細胞株、単核細胞、骨髓培養系 (Suda T. et al. (1990) Med. Res. Rev. 7:33-366; Suda T. et al. (1992) J. Cell Biochem. 49:53-58) がある。選択された化合物をさらに、例えば大理石骨病の動物モデル及びヒトの疾患において *in vivo*

でテストしてもよい (Shapira F (1993) Clin, Orthop. 294:34-44)。

ある好適な実施例では、式I又はIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物の薬学的製剤を被験体に投与することで、未処置の被験体に比較して状態を改善させるステップを含む、骨粗鬆症を治療する方法が提供される。骨粗鬆症の治療にビタミンD<sub>3</sub>化合物を用いることの合理性は、高齢者の被験体において1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>の血清中濃度が減少していることを示す研究で裏付けられている (Lidor C. et al. (1993) Calcif. Tissue Int. 52:146-148)。動物モデル及びヒトでビタミンD<sub>3</sub>化合物を用いた in vivoの研究はBouillon, et al. (1995) Endocrine Reviews 16 (2) :229-231に説かれている。

式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物を、卵巣切除したイヌ、げっ歯類、などの動物でテストして、正常及びエストロゲン欠乏動物の両方における骨量及び骨形成速度の変化を評価してもよい。担当医が臨床的な試行試験をヒトに行なって、骨粗鬆症を防止及び治療する上での式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物の治療上有効量を決定することも可能である。

テストするのに好適な化合物には、ラットの骨肉腫細胞株UMR-106で1 $\alpha$  (OH)-3-エピ-D<sub>3</sub>の産生を示す、実施例IIに示されるような3-エピ型の3-エピ型の1 $\alpha$  (OH) D<sub>3</sub>がある。1 $\alpha$  (OH) -D<sub>3</sub>の3エピ転化は、この化合物の優れた可能性を呈するものである。

別の実施例では、式I及びIIの本ビタミンD<sub>3</sub>化合物の治療上の用途には、代謝的なカルシウム欠乏及びリン酸欠乏を特徴とするその他の疾患の治療が含まれる。このような疾患の例には、以下、骨粗鬆症、骨ジストロフィー、骨軟化症、くる病、のう胞性線維性骨炎、腎性骨ジストロフィー、骨硬化症、抗痙攣治療、オステオペニア、線維形成-骨形成不全、続発性副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症、硬変症、閉塞性黄疸、薬物起因性代謝、髄様癌、慢性腎疾患、低リン酸血症VDRR、ビタミンD依存性くる病、サルコイドーシス、糖質コルチコイド拮抗作用、吸収不良症候群、脂肪便、熱帯性スプルー、突発性高カルシウム血症、及び乳熱がある。

ホルモン分泌

さらに別の態様では、本発明は、内分泌細胞などのビタミンD3応答性細胞のホルモン分泌を調節する方法を提供するものである。「ホルモン分泌」という言語は当業において認識されており、例えば副甲状腺ホルモン(PTH)、カルシトニン、インシュリン、プロラクチン(PRL)及びTRHなど、あるホルモンのビタミンD3応答性細胞での分泌に関与する転写及びプロセッシングを制御する式I及びIIのビタミンD3化合物のゲノムの及び非ゲノムの活性の両方を含む(Bouillon, R. et al. (1995) *Endocrine Reviews* 16 (2):235-237)。ここで用いられる「ビタミンD3応答性細胞」という言語は、あるホルモンの遺伝子発現及び／又は転写後プロセッシング分泌を変更することにより、式I及びIIのビタミンD3化合物に応答する内分泌細胞を含むものとして意図されている。内分泌細胞の例には、とりわけ副甲状腺細胞、膵細胞、下垂体細胞、がある。

本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoで行なってもよい。式I及びIIのビタミンD3化合物を最初にin vitroで副甲状腺細胞の初代培養でテストしてもよい。利用可能なその他の系には、ラットの下垂体腫瘍細胞、例えばGH4C1細胞株におけるプロラクチン分泌のテスト(Wark J.D. and Tashjian Jr. A.H. (1982) *Endocrinology* 111:1755-1757; Wark J.D. and Tashjian Jr. A.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:2118-2121; Wark J.D. and Gurtler V. (1986) *Biochem. J.* 233:513-518)及びGH4C1細胞でのTRH分泌のテストが含まれる。あるいは、式I及びIIのビタミンD3化合物の作用をNko M. et al. (1982) *Miner. Electrolyte Metab.* 5:67-75; Oberg F. et al. (1993) *J. Immunol.* 150:3487-3495; Bar-Shavit Z. et al. (1986) *Endocrinology* 118:679-686; Testa U. et al. (1993) *J. Immunol.* 150:2418-2430; Nakamaki T. et al. (1992) *Anticancer Res.* 12:1331-1337; Weinberg J. B. et al. (1987) *Blood* 70:994-1002; Chambaut-Guérin A.M. and Thomopoulos P. (1991) *Eur. Cytokine New.* 2:355; Yoshida M. et al. (1992) *Anticancer Res.* 12:1947-1952; Momparler R. L. et al. (1993) *Leukemia* 7:17-20; Eisman J. A. (1994) *Kanis. JA (ed) Bone and Mineral Research* 2:45-76; Veyron P. et al. (1993) *Transplant Immu*

nol. 1:72-76; Gross M. et al. (1986) J Bone Miner Res. 1:457-467; Costa E. M. et al. (1985) Endocrinology 117:2203-2210; Koga M. et al. (1988) Cancer Res. 48:2734-2739; Franceschi R. T. et al. (1994) J. Cell Physiol. 123:401-409; Cross H. S. et al. (1993) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 347:105-110; Zhao X. and Feldman D. (1993) Endocrinology 132:1808-1814; Skowronski R. J. et al. (1993) Endocrinology 132:1952-1960; Henry H. L. and Norman A. W. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62:781-788; Wecksler W. R. et al. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 201:95-103; Brumbaugh P. F. et al. (1975) Am. J. Physiol. 238:384-388; Oldham S. B. et al. (1979) Endocrinology 104:248-254; Chertow B. S. et al. (1975) J. Clin. Invest. 56:668-678; Canterbury J. M. et al. (1978) J. Clin. Invest. 61:1375-1383; Quesad J. M. et al. (1992) J. Clin. Endocrinol. Metab. 75:494-501に説かれたような動物モデルを用いて *in vivo* で特徴付けることもできる。

いくつかの実施例では、本発明のビタミンD3化合物を用いて、副甲状腺ホルモン(PTH) プロセッシング、例えば転写プロセッシング、翻訳プロセッシングなど、及び/又は、副甲状腺細胞の分泌を治療プロトコルの一部として阻害することができる。これらの化合物を用いた治療法は、一次又は二次応答などのPTH活性の直接的又は間接的作用の関与する、あらゆる疾患に容易に応用することができる。例えば、当業においては、PTHが1,25-ジヒドロキシビタミンD3の形成を腎臓で誘導し、これがひいては腸管からのカルシウムおよびリン酸の吸収を増加させることで高カルシウム血症を引き起こすことが知られている。このように、PTHプロセッシング及び/又は分泌を阻害すると、PTHが *in vivo* で媒介する応答のすべてを間接的に阻害することになるであろう。従って、これらの式I及びIIのビタミンD3化合物の治療上の用途には、慢性腎不全の続発性副甲状腺機能亢進症などの疾患の治療がある (Slatopolsky E. et al. (1990) Kidney Int. 38:S41-S47; Brown A. J. et al. (1989) J. Clin. Invest. 84:728-732)。治療上の有効量及び投薬計画は、当業者であれば当業で説明されたデータを用いて決定することができる。

#### ニューロン喪失に対する防御

また別の態様では、本発明は、例えばニューロン細胞などのビタミンD3応答性

細胞を式I又はIIのビタミンD3化合物に接触させてニューロン喪失を防止又は遅らせることにより、ニューロン喪失に対して防御する方法を提供するものである。「に対して防御する」という言語は、ニューロンの劣化、損傷、又は死の防止、遅延、及び／又は停止を含むものとして意図されている。ここで用いられる「ビタミンD3応答性細胞」という言語は、遺伝子発現及び／又は細胞内代謝を変更することにより式I及びIIのビタミンD3化合物に応答するニューロン細胞を含むものとして意図されている。ニューロン細胞の例には、とりわけ海馬細胞、ドーパミン作動性細胞、コリン作動性細胞がある。

ニューロンの喪失は、その正常な機能が失われるような、あらゆるニューロンの状態の結果であってもよい。ニューロンの劣化は、ニューロンの喪失につながると思われる、ニューロンの機能を失うようなあらゆる状態の結果であってもよい。ニューロンの機能は例えばニューロンの生化学、生理学又は解剖学的変化により失われることがある。ニューロンの劣化には、ニューロンが正常な機能を果たすには有害である膜、樹状突起又はシナプスの変化を含めてもよい。ニューロンの劣化、損傷、及び／又は死の原因は未知でもよい。あるいは、それは、被験体の神経系で起きる年齢及び／又は疾患に関連した変化の結果であってもよい。

ニューロンの喪失が「年齢に関連した」とここで述べられる場合、加齢に係る被験体での既知の及び未知の身体変化が原因のニューロン喪失を含むものとして意図されている。ニューロン喪失がここで「疾患に関連した」と述べられる場合、疾患に関連した被験体における既知の及び未知の身体変化が原因のニューロン喪失を含むものとして意図されている。しかしながら、これらの術語が相互に除外的であることはなく、実際にはニューロンの喪失を起こす多くの状態が年齢及び疾患の両方に関連している。

ニューロン喪失及びニューロンの形態学的変化を伴う年齢に関連した疾患の例には、例えば、アルツハイマー病、ピック病、パーキンソン病、血管疾患、ハンチントン舞踏病、及び年齢関連記憶障害がある。アルツハイマー病患者では、ニュー

ロンの喪失は海馬、前頭、頭頂葉、及び前皮質、小脳扁桃、及び嗅覚系で最も顕

著である。海馬で最も著しく罹患する領域には、CA1領域、海馬台、及び内側嗅皮質がある。記憶喪失は、海馬が記憶にとって重要な役割を果たしていることがよく知られているため、初期及び最も代表的な認知変化であると考えられる。ピック病は、場合によっては線条のニューロンの死を伴う前頭葉及び前葉の新皮質での重篤なニューロン劣化を特徴とする。パーキンソン病は黒質及び青斑核におけるニューロンの喪失で判明させることができる。ハンチントン舞踏病は線条体内及び皮質のコリン作動性ニューロン及びGABA作動性ニューロンの劣化を特徴としている。パーキンソン病及びハンチントン舞踏病には多くの場合、運動異常が伴うがしばしば認知障害（記憶喪失）も呈する。

年齢関連記憶障害 (AAMI) は年齢に関連したもう一つの異常であり、健康な高齢者での記憶喪失を特徴とする。Crook, T. et al. (1986) Devel. Neuropsych. 2 (4) :261-276. 現在では、AAMIの神経原理が精密に定義されている。しかしながら、加齢によるニューロンの死は、皮質、海馬、小脳扁桃、基底核、コリン作動性基底前脳、青斑核、縫線核、及び小脳を含め、記憶に関連するとされた脳内領域の多くの種で起きると報告されている。Crook, T. et al. (1986) Devel. Neuropsych. 2 (4) :261-276.

式I及びIIのビタミンD3化合物は、ゲノム又は非ゲノムの機序により、ニューロン喪失に対して防御を行なうことができる。核内ビタミンD3レセプタは、辺縁にあることが知られているが、さらに脳、特に海馬及び新皮質にも見つまっている。非ゲノムの機序もまた、ニューロン内及び／又は辺縁のカルシウム及びリン酸の量を調節することによりニューロン喪失を防止又は遅延させることができるかも知れない。さらに、式I及びIIのビタミンD3化合物は、例えば血清中PTH量を調節するなど、間接的に作用することによりニューロン喪失に対する防御を行なえるかも知れない。例えば、アルツハイマー病で血清PTH量と認知低下との間に正の相関関係があることが実証されている。

本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoで行なってもよい。式I及びIIのビタミンD3化合物をまず、げっ歯類の胎児からとったニューロン (例えば米国特許第



5, 179, 109号の胎児ラット組織培養を参照されたい)、又はその他の哺乳類(例えば米国特許第5, 089, 517号の胎児マウス組織培養を参照されたい)あるいは非哺乳類の動物モデルを用いてin vitroでテストしてもよい。これらの培養系を用いて、とりわけ虚血、脳卒中、外傷、神経圧挫、アルツハイマー病、ピック病、及びパーキンソン病の動物又は組織培養モデルで辺縁系や中枢神経系のニューロン防御が特徴付けられてきた。新皮質ニューロンの破壊の防止を研究するためのin vitro系の例には、予め様々なグルタミン酸アゴニスト、例えばカイニン酸、NMDA、及び $\alpha$ -アミノ-3-5-ドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロネート(AMPA)など、に曝した胎児マウスニューロン及びグリア細胞のin vitro培養株の利用がある。米国特許第5, 089, 517号。さらに米国特許第5, 170, 109号(ラット皮質/海馬ニューロン培養株を神経保護化合物で処置する前にグルタミン酸塩で処置)、米国特許第5, 163, 196号及び第5, 196, 421号(ラットで神経保護興奮性アミノ酸レセプタアンタゴニストがグリシン、カイニン酸、AMPAレセプタ結合を阻害する)も参照されたい。

あるいは、式I及びIIのビタミンD3化合物の作用を、in vivoで動物モデルを用いて特徴付けることができる。これらのモデル系でのニューロン劣化はしばしば、実験傷又は介入(例えば毒素の塗布、神経圧挫、酸素供給の中断)により誘発される。例えば、興奮性アミノ酸神経伝達物質レセプタである特定のN-メチル-D-アスパラギン酸塩(NMDA)のアンタゴニストが、抗けいれん薬及び神経保護薬として有用であることを実証するために、米国特許第4, 957, 909号の発明者たちは、スイス・アルビノマウス及びラットの海馬ニューロンにNMDAアンタゴニストの処置を施した後に興奮性アミノ酸レセプタの過刺激を行なったモデルを用いた。神経劣化を防止する薬剤としてのいくつかのNMDAアンタゴニストの実用性を、マウスをNMDAアンタゴニストで処置した後にNMDAで処置することにより実証した同様の研究も行なわれた。米国特許5, 168, 103号である。

#### 平滑筋細胞

さらに別の態様では、本発明は、ビタミンD3応答性平滑筋細胞を式I又はIIのビタミンD3化合物に接触させて前記細胞を活性化する、又は好ましくはその活性

を阻害することにより、血管平滑筋細胞の活性を調節する方法を提供するものである。「平滑筋細胞の活性」という言語は、増殖、移行、接着及び／又は代謝など、平滑筋細胞のあらゆる活性を含むものとして意図されている。

いくつかの実施例では、式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物を用いて、ビタミンD<sub>3</sub>応答性平滑筋細胞の異常な活性に関連する疾患及び状態を治療することができる。例えば、本発明を、増殖過多血管症、例えば高血圧が誘起する血管リモデリング、血管再狭窄、及びアテローム性動脈硬化症、の治療に用いることができる。別の実施例では、本発明を、動脈性高血圧症など、ビタミンD<sub>3</sub>応答性平滑筋細胞の異常な代謝を特徴とする異常を治療するのに用いることができる。

本方法は、培養株中の細胞、例えばin vitro又はex vivoで行なっても、又は、動物の被験体中の細胞、例えばin vivoで行なってもよい。式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物をまず、Catellot et al. (1982), J/Biol. Chem. 257 (19): 11256に説かれたようにin vitroでテストしてもよい。

本発明をさらに以下の実施例で説明することとするが、同実施例はさらなる限定を行なうものであるとみなされではない。当業者であれば、細胞中での式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>の産生は、このような化合物がこのような細胞において生活性があり、従ってこのような細胞の異常な活性が原因である状態を治療する際に利用可能であることを示していることを理解されよう。例えば、ケラチノサイト中での式I及びIIのビタミンD<sub>3</sub>化合物の生成は、このようなビタミンD<sub>3</sub>化合物はこれらの細胞で生活性があり、乾癬などの状態を治療するのに利用可能であることを示唆している。本出願を通じて引用された（文献、発行済特許、公開済特許出願、及び同時係属特許出願を含む）全参考物の内容は参考としてここに編入されていることをここに明示しておく。

## 実施例

### 実施例I: 1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシ-ビタミンD<sub>3</sub>の環状エーテル代謝産物のヒト・ケラチノサイトにおける単離及び同定

ここで説明するように、1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>-3-エピ-D<sub>3</sub>はヒト・ケラチノサイトで代謝されると、ピークM1で1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>-3-エピ-D<sub>3</sub>より極性の低い代謝産物になる (図2

)。図2は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピD}_3$  (1 $\mu\text{M}$ )と一緒に24時間インキュベートされたヒトケラチノサイトで生成された代謝産物のHPLC輪郭及びUVスペクトルを示す。直相HPLC系では、この代謝産物(M1)は $25(\text{OH})\text{D}_3$ よりも極性が高いが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりも極性が低く、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ のそれと同様であった。質量スペクトル分析の結果、 $414\text{m/z}$ の分子イオンが判明したが、これは図3に示される、開始時の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりも2質量単位小さい。図3は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピD}_3$  (1 $\mu\text{M}$ )と一緒に24時間インキュベートしたヒト・ケラチノサイトから単離された、 $1\alpha(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピD}_3$  (M) (上側のパネル) 及びその環状エーテル代謝産物(M1) (下側のパネル) の質量スペクトルを示す。 $\text{m/z}134$ 及び $152\text{m/z}$ での典型的フラグメントは、修飾されていないA環及びシストリエン構造を示唆している。C、D環又は側鎖のいずれかに導入された二重結合は、この分子量と一致しているかも知れない。しかしながら、この種類の不飽和代謝産物はそれでも遊離した25ヒドロキシ基を持ち、開始時の化合物と同じような維持時間を有すると予測されるが、これは観察されたことと矛盾する。さらに、 $59\text{m/z}$ で質量フラグメントがないことは、25ヒドロキシ基がないことを示唆している。 $251$ 、 $269$ 及び $287\text{m/z}$ におなじみの側鎖開裂フラグメントがないこともまた、修飾された25ヒドロキシ基及びおそらくは構造変化がC-20にあるために炭素17及び20での開裂が遅れたことを示唆している。図3及び4に示されるような環状構造は、これらの質量スペクトル及びクロマトグラフィによる証拠で裏付けられる。この提案される構造は、 $\text{m/z}58$  (アセトン) が消失して $\text{m/z}356$ と続くフラグメントが $338$ 、 $320$ 及び $314$ に形成されたことと一致している。

A環での3-エピマー化により、交互の側鎖反応が可能となったことが考えられる。図4は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピD}_3$ の環状エーテル代謝産物の形成のための提案される

代謝経路を示す。この経路は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピD}_3$ の環状エーテル代謝産物の形成のための提案される

代謝経路を要約した図である。環状エーテル構造の形成は、C-17又はC-20でのヒドロキシ化、それに続いて25-ヒドロキシ基が反応して図4に示されるようなエーテル結合が形成された結果かも知れない。この種類の代謝反応はヒドロキシ化脂肪酸で起きることが知られている。このように、未知の代謝産物のうち

のいくつかは、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}3\text{-エピ-D}_3$ のC-17又はC-20化ドロキシル化代謝産物である可能性がある。

#### 実施例II: ヒト・ケラチノサイト中の $1\alpha$ ヒドロキシ-ビタミン $\text{D}_3$ の3-エピ代謝産物の単離及び同定

図5Aは、骨肉腫株UMR-106における $1\alpha(\text{OH})\text{-D}_3$ のその3-エピ型への代謝を示す。ピークAは3-エピ型の $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を示す。ピークBは基質である $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ に相当する。挿入パネルは、光ダイオードアレイ検出器で観察された様々な代謝産物のUVスペクトルを示す。図5Bは、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ への3-エピマー化の概略図である。 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ と同様、 $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ は25-ヒドロキシル化型にin vivoで転化させることができる。

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 化合物は現在、骨粗鬆症の治療に用いられている。従って、これらの化合物の3-エピ型を $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 化合物の代用として骨粗鬆症の治療に用いることができよう。

#### 実施例III: $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ の3-エピ配置の確認

$1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ の骨細胞での産生を確認するために、骨肉腫細胞株(UMR-106)の産生した $1\alpha\text{-}3\text{-エピ-D}_3$ の代謝産物を質量スペクトル法で分析した。図6は $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ (上側のパネル)及びその3-エピ代謝産物(下側のパネル)の質量スペクトルを示す。これら二つの質量スペクトルを比較したところ、ピークに違いが観察されたのは3-エピ代謝産物、例えば分子量が約 $m/z$ 57、217、312及び529(下側のパネル)のフラグメントだけであることが判明した。3-エピ代謝産物の質量スペクトルは、個別に $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ であることが確認された。

#### 実施例IV: $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ の、その異性体に比較したときのより高いIn Vivoでの安定性

in vivoでの $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ の安定性を、様々な時点で $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピビタミンD}_3$ 及びその異性体の濃度変化を観察することにより特徴付けた。具体的には、図7は、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ と一緒に24、48、又は84時間インキュベートしたラットの骨肉腫細胞株(UMR-106)で生成された代謝産物のHPLC輪郭及びUVスペクトルを示す。ピークM及びSは、それぞれ、テストされた時点での $1\alpha(\text{OH})\text{-}3\text{-エピ}$

ビタミンD<sub>3</sub>及びその異性体の相対的濃度を表す。48及び84時間のインキュベート後でピークSに対するピークMの相対的持続時間は、1 $\alpha$  (OH) D<sub>3</sub>の3-エピ代謝産物は、その異性体よりもin vivoでより安定していることを示唆している。

#### 等価物

当業者であれば、ごく通常の実験を行なうのみで、ここに記載された本発明の具体的な実施例の等価物を数多く認識され、又は確認可能であることであろう。このような等価物は以下の請求の範囲の包含するところとして意図されている。

【図1】

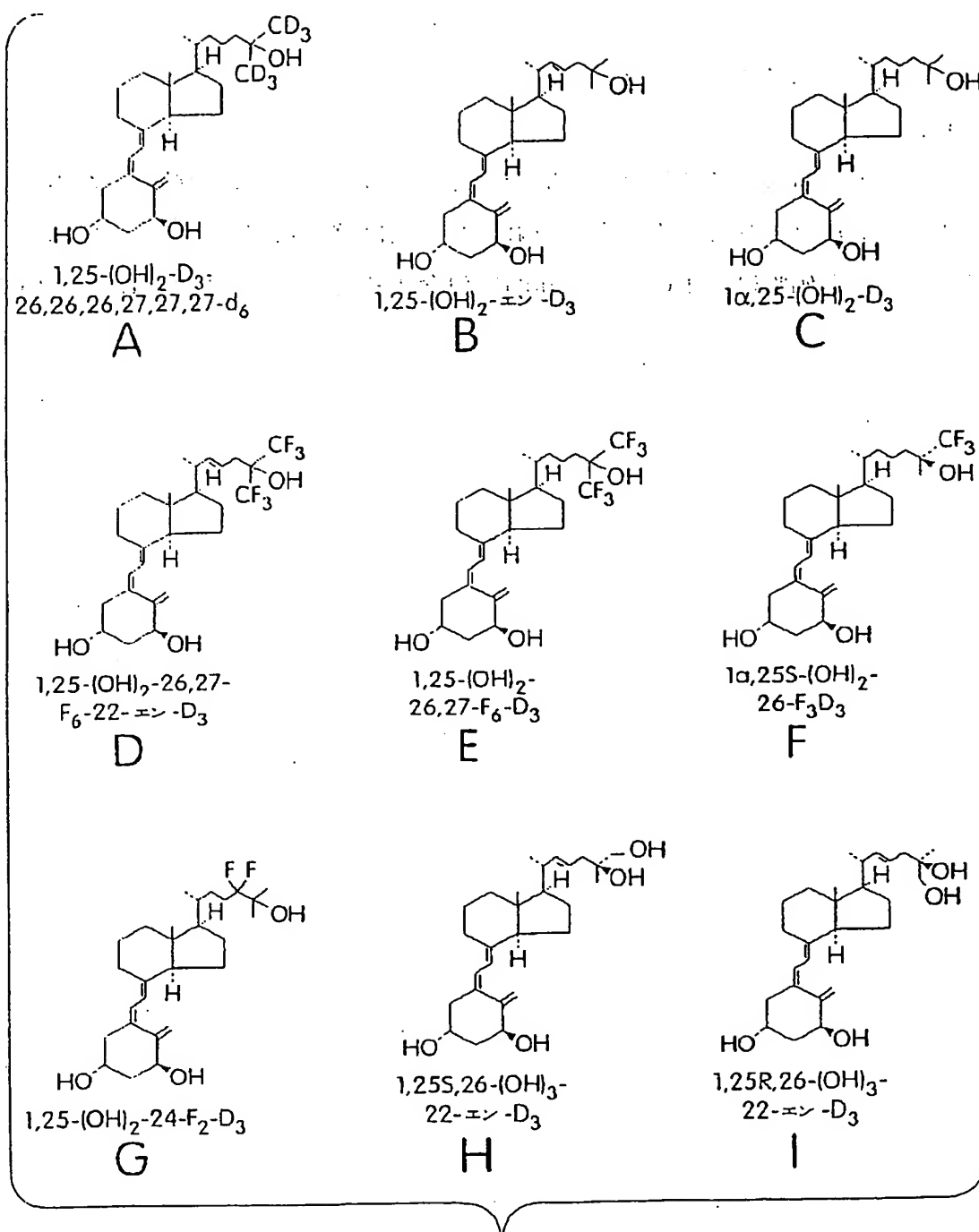


Fig. 1

【図1】

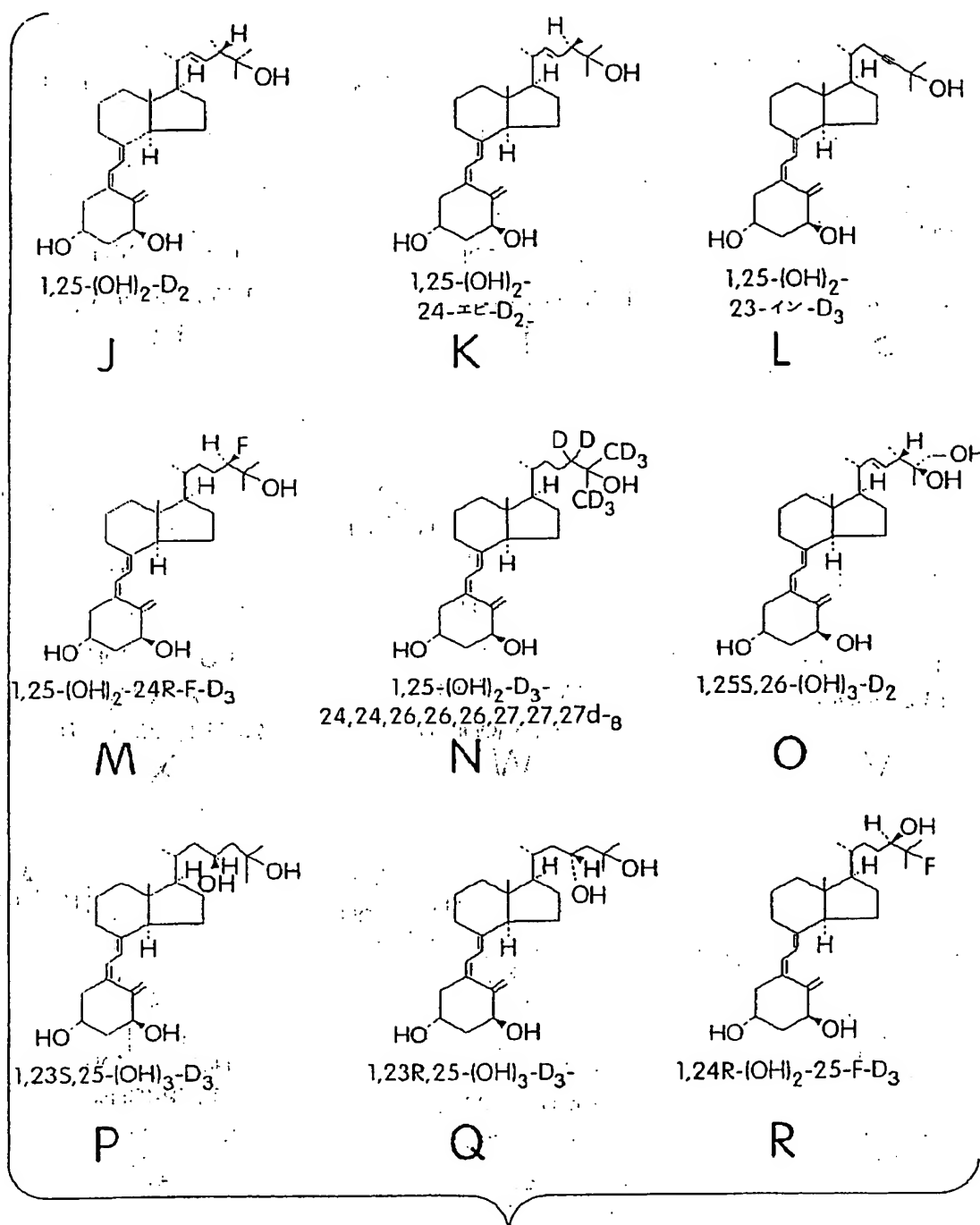


Fig. 1 Cont.

【図1】

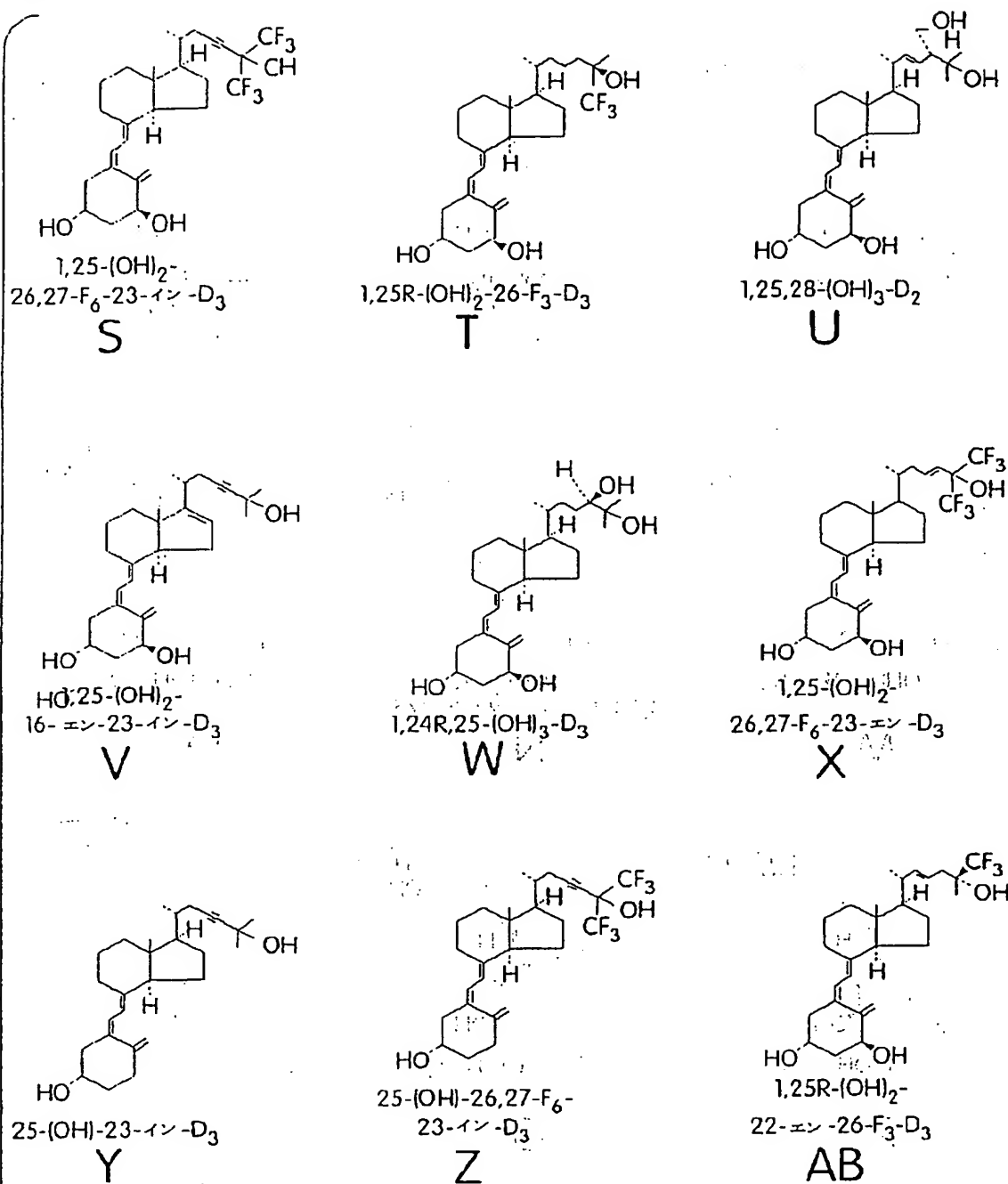


Fig. 1Cont.



【図1】

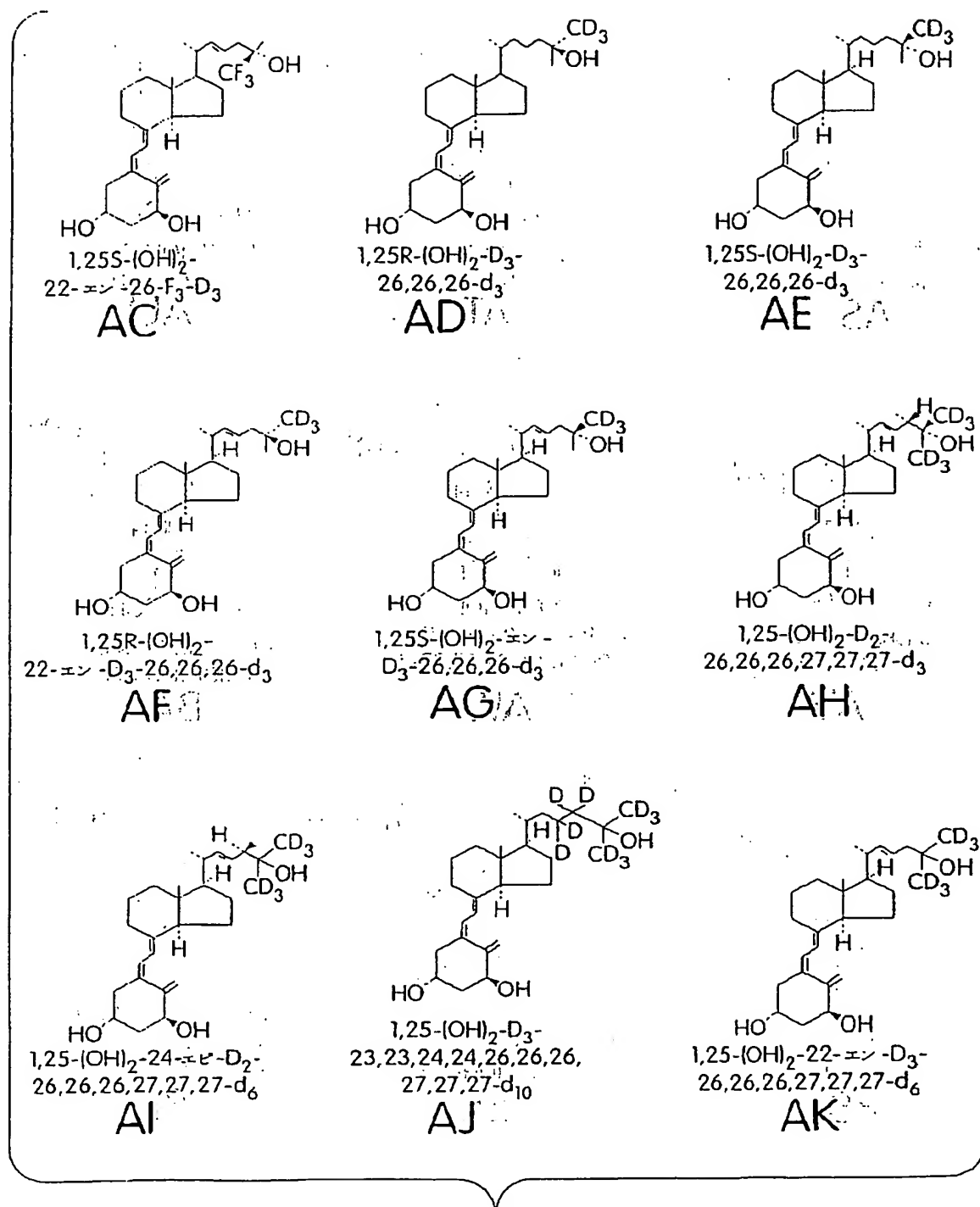


Fig. 1Cont.

【図1】

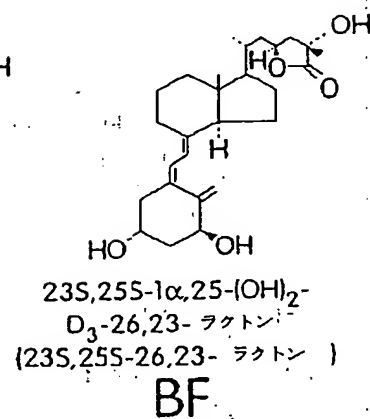
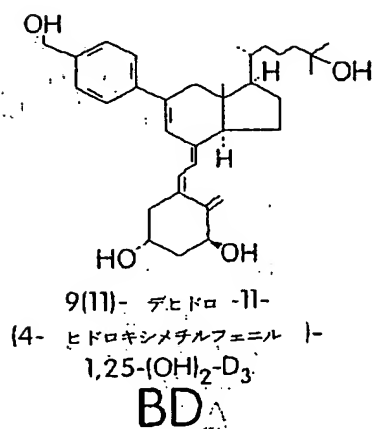
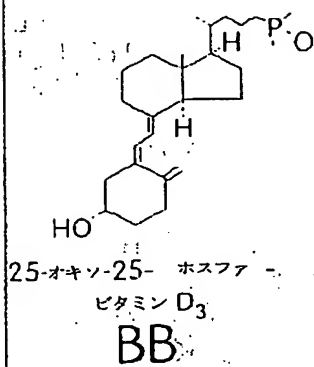
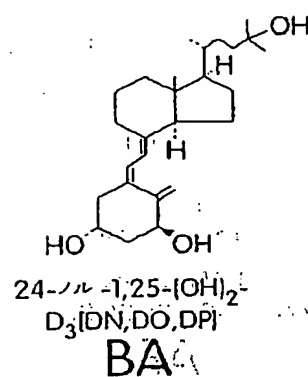
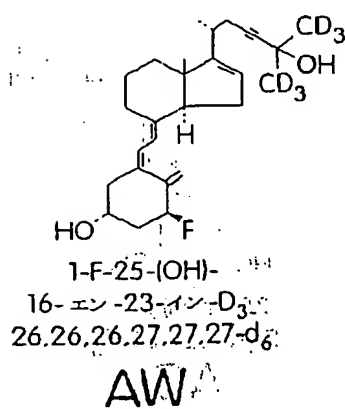
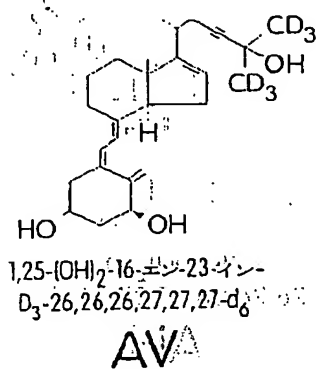
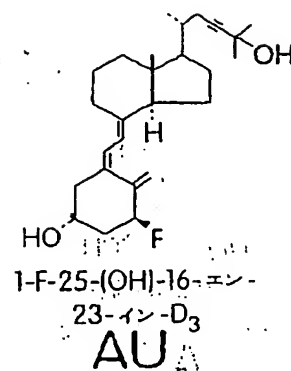
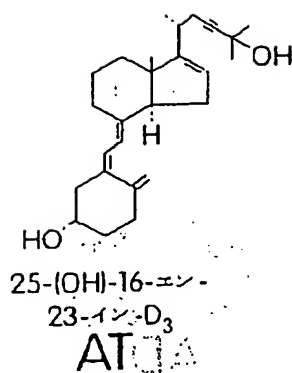
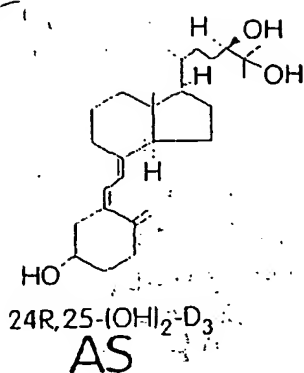


Fig.1.Cont.

【図1】

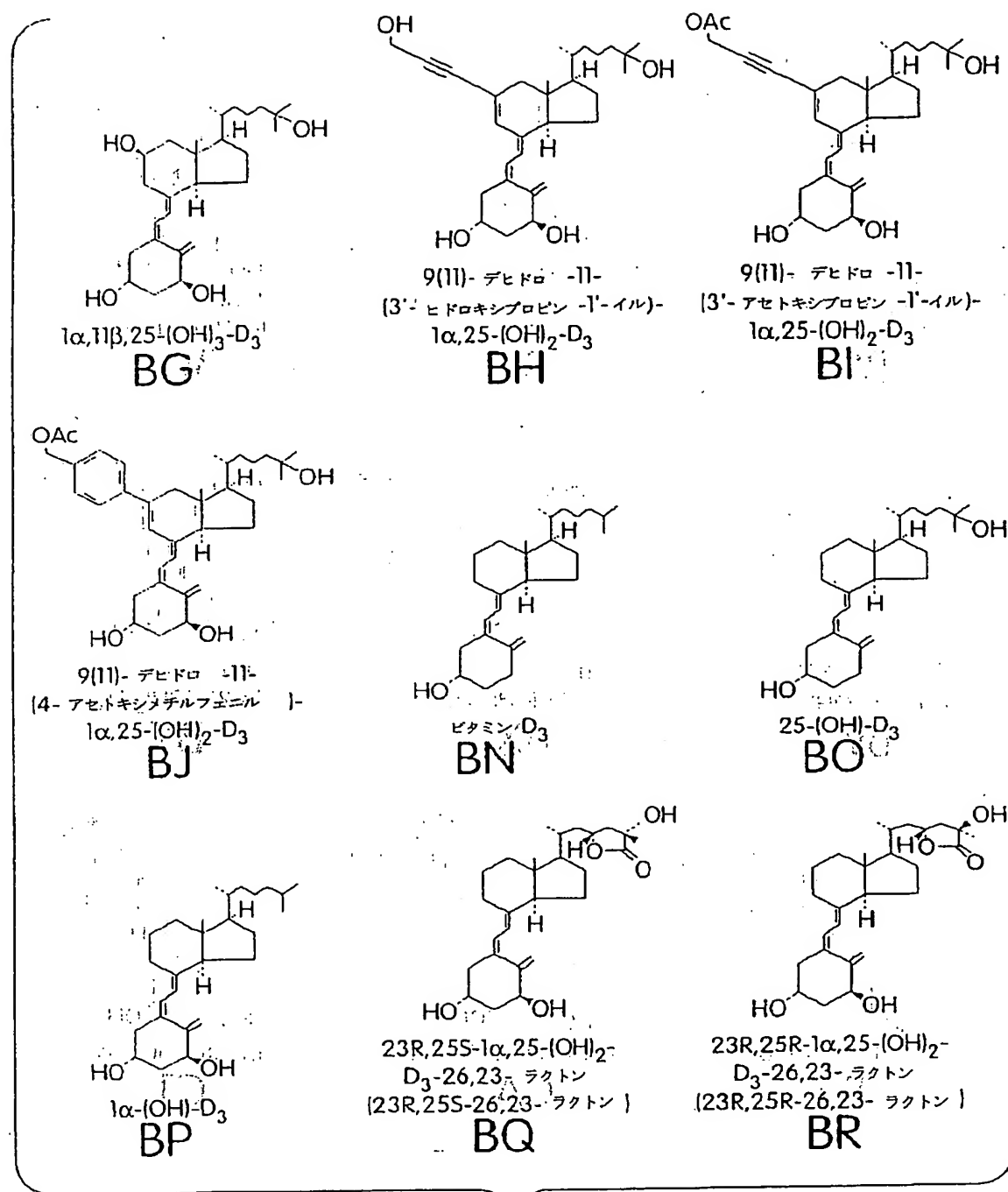


Fig. 1CONT.

【図1】

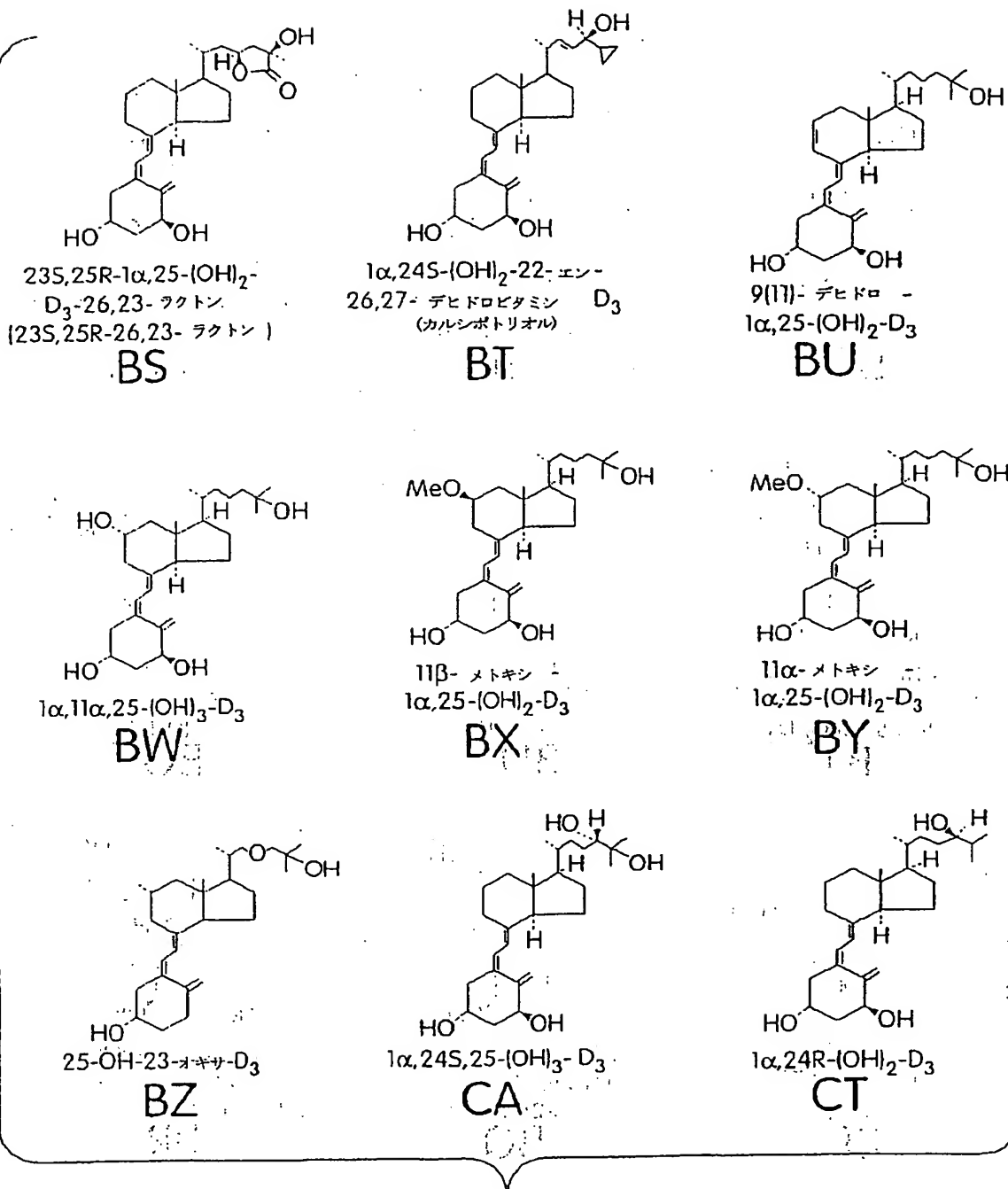


Fig. 1Cont.

【図1】

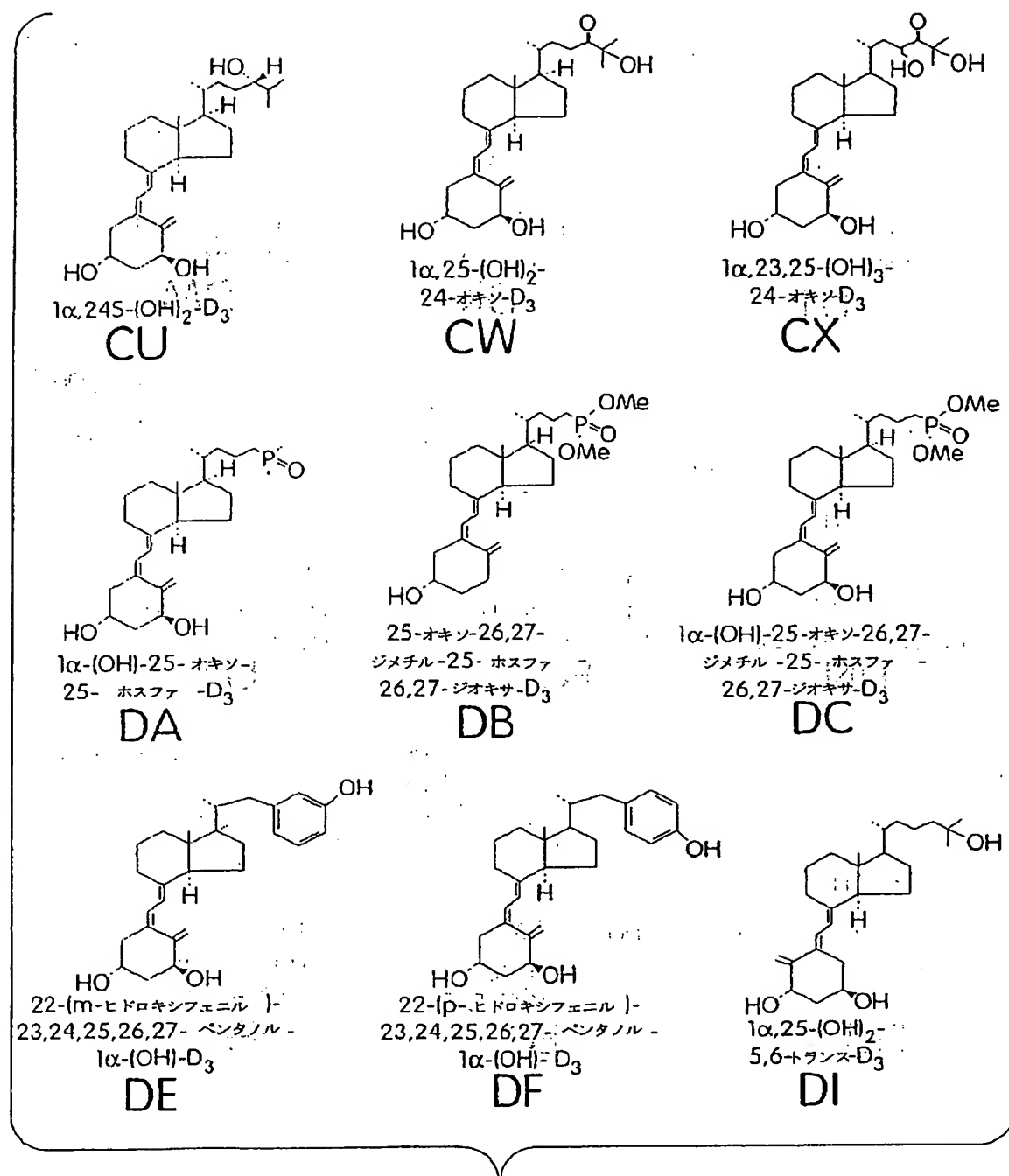


Fig. 1Cont.

【図1】

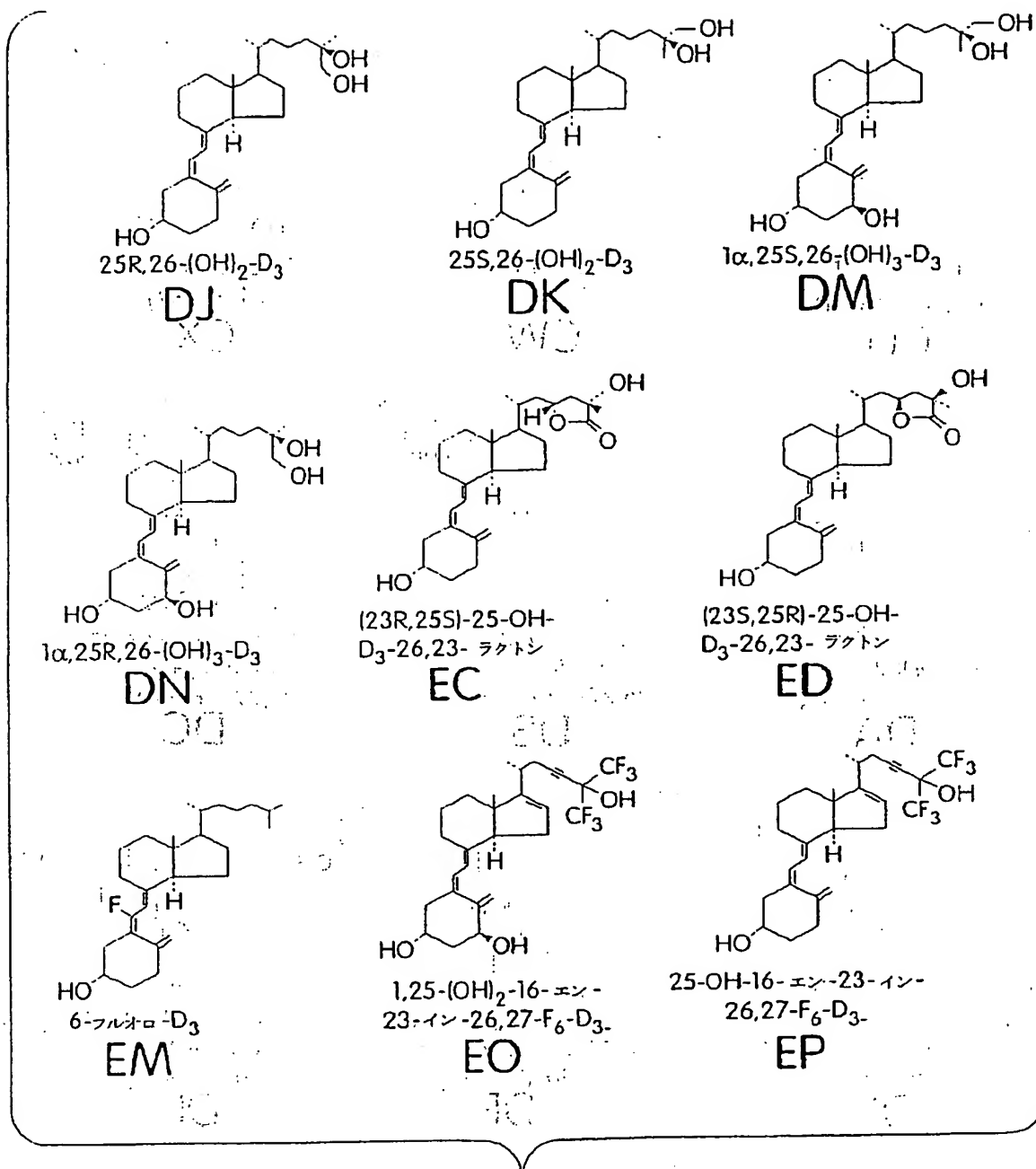


Fig. 1Cont.

【図1】

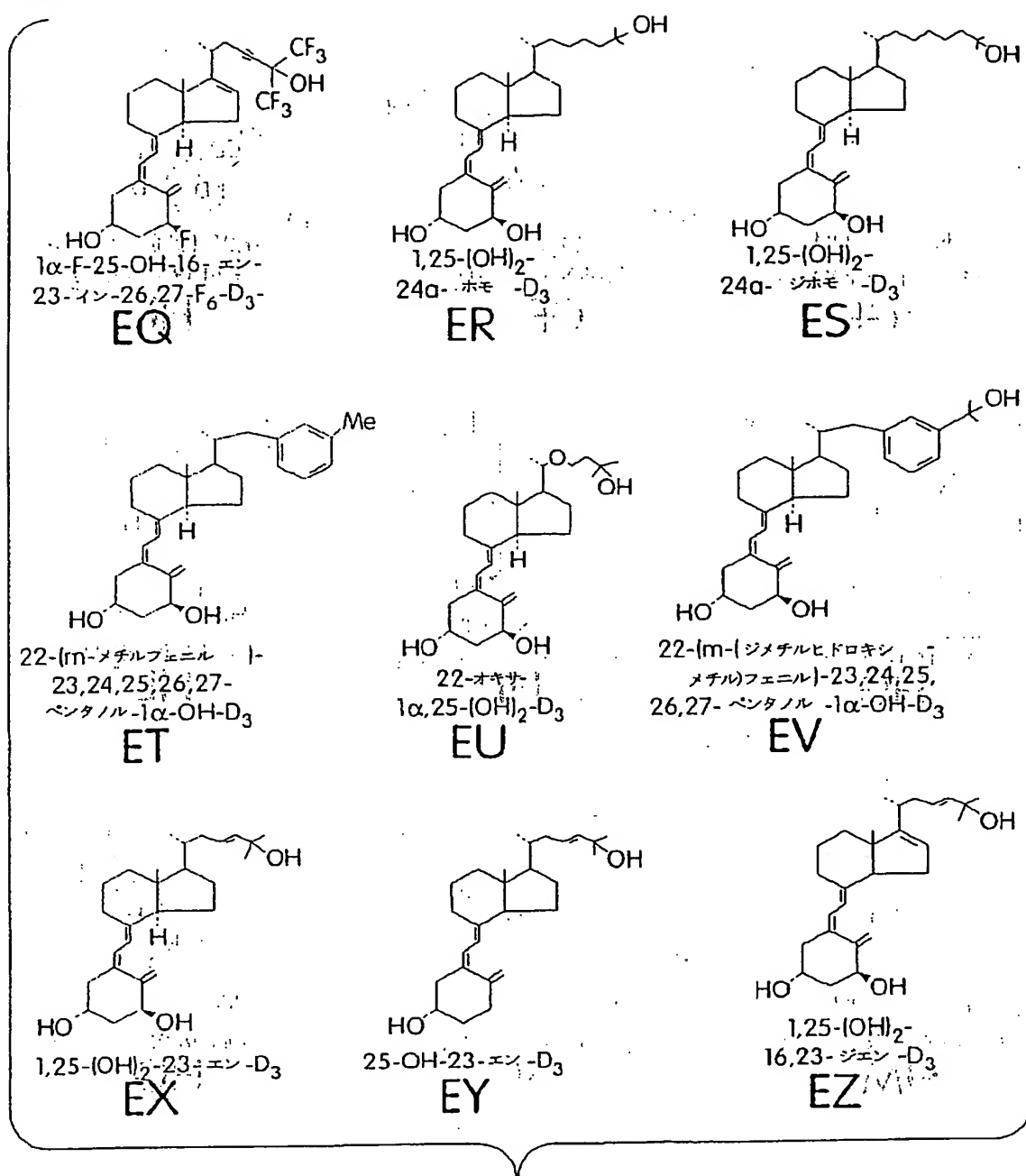


Fig. 1Cont.

【図1】

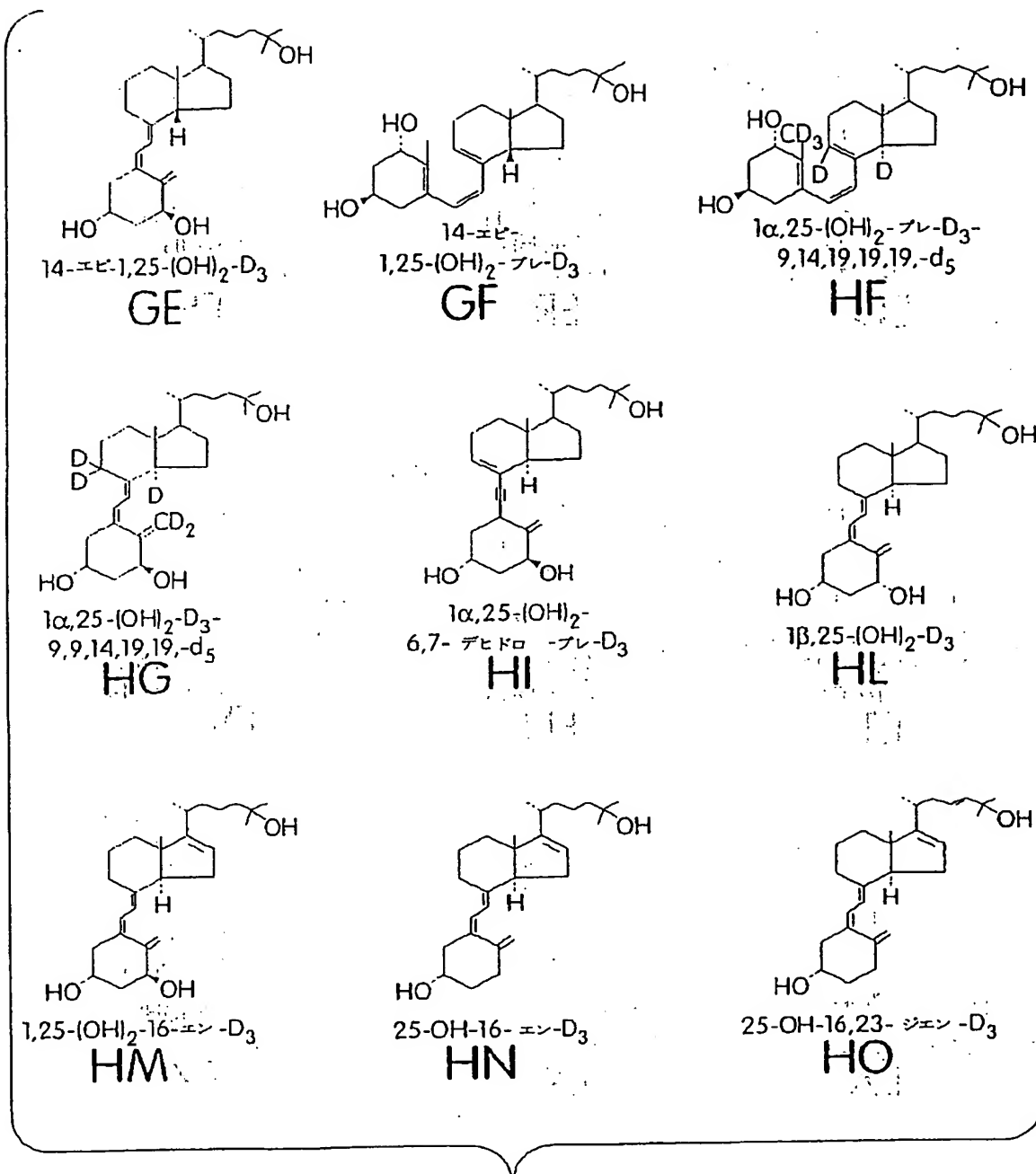


Fig. 1 Cont.



【図1】

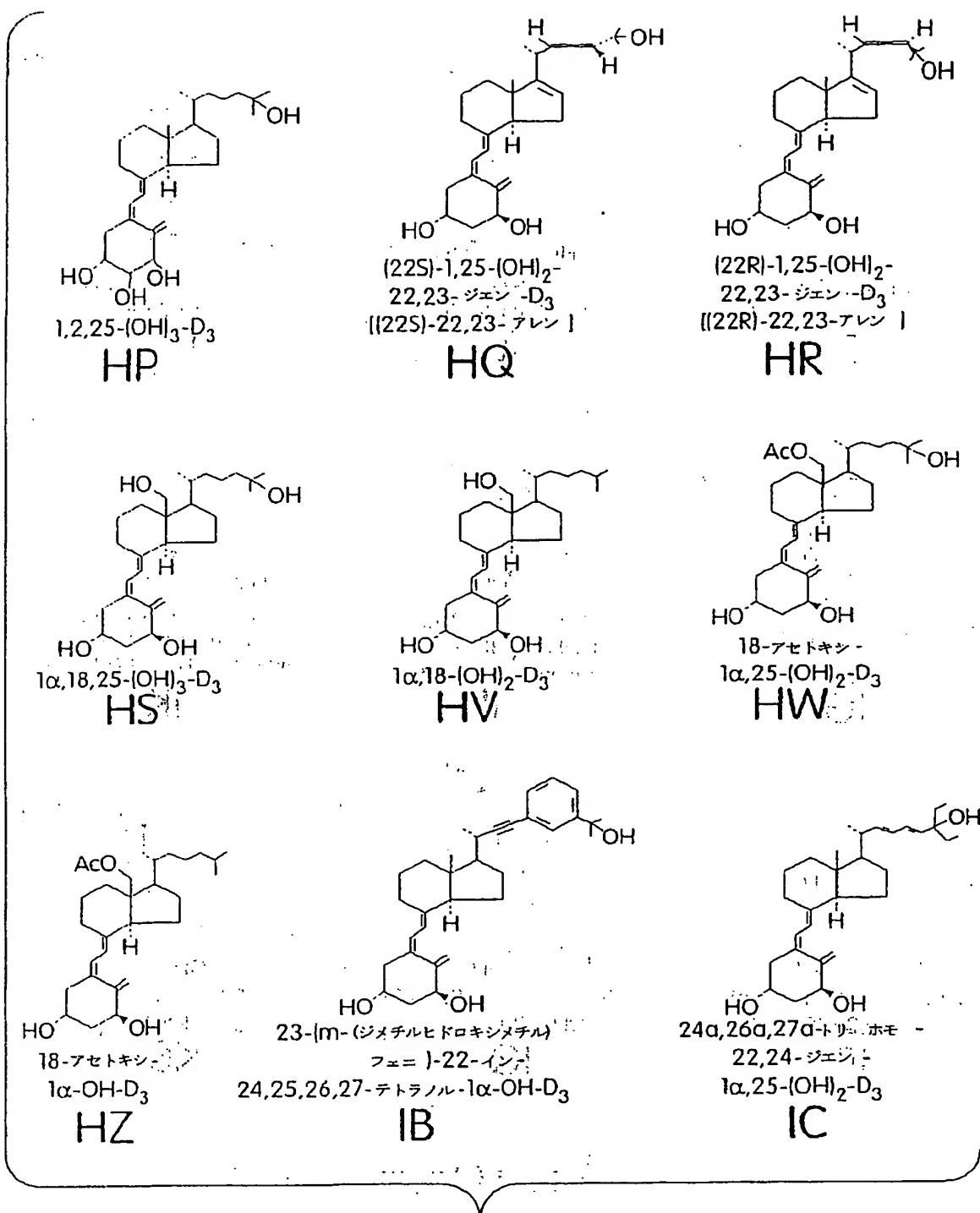


Fig. 1Cont.

【図1】

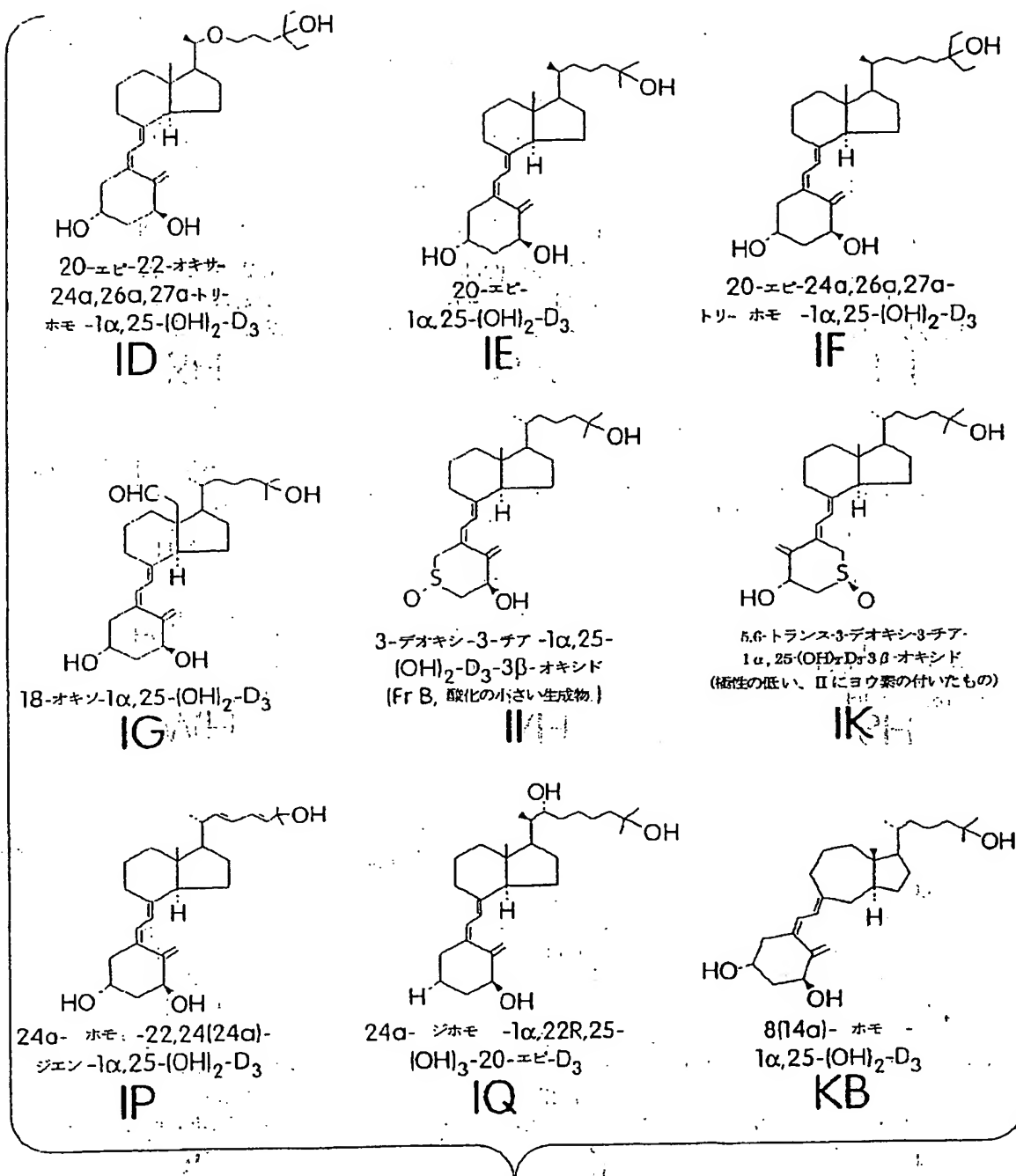


Fig. 1Cont.

【図1】

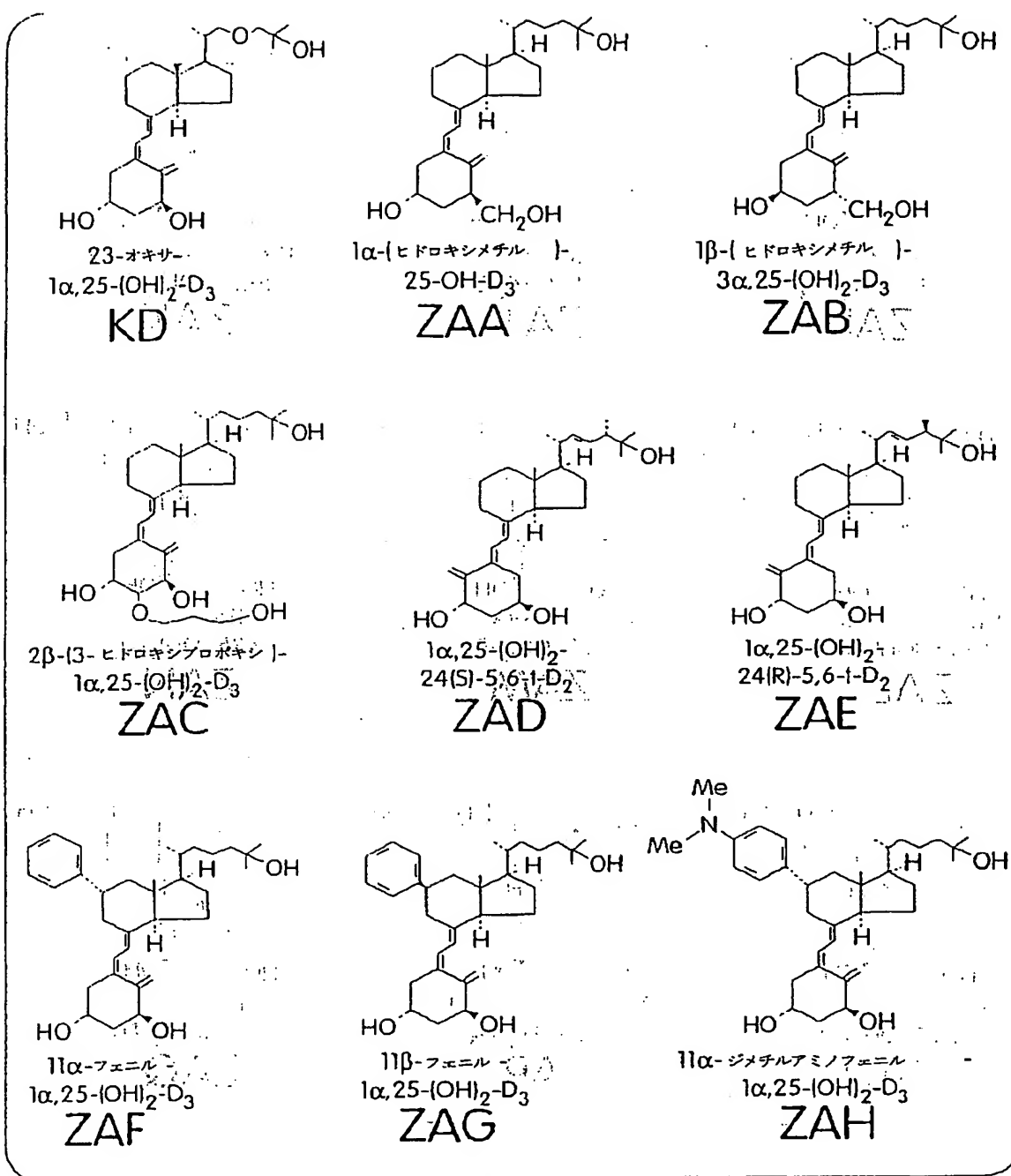


Fig. 1Cont.

【図1】

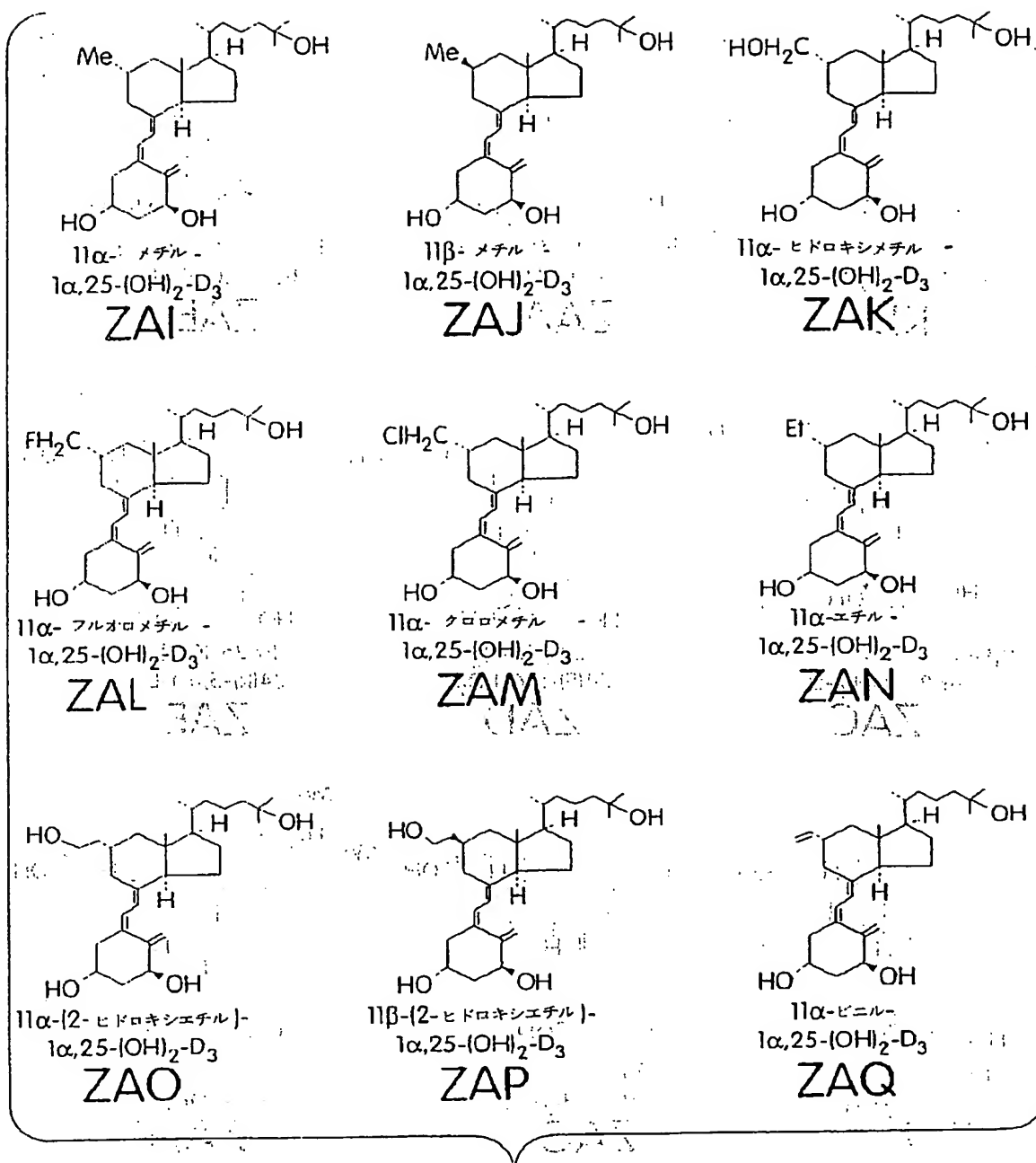


Fig. 1Cont.

【図1】

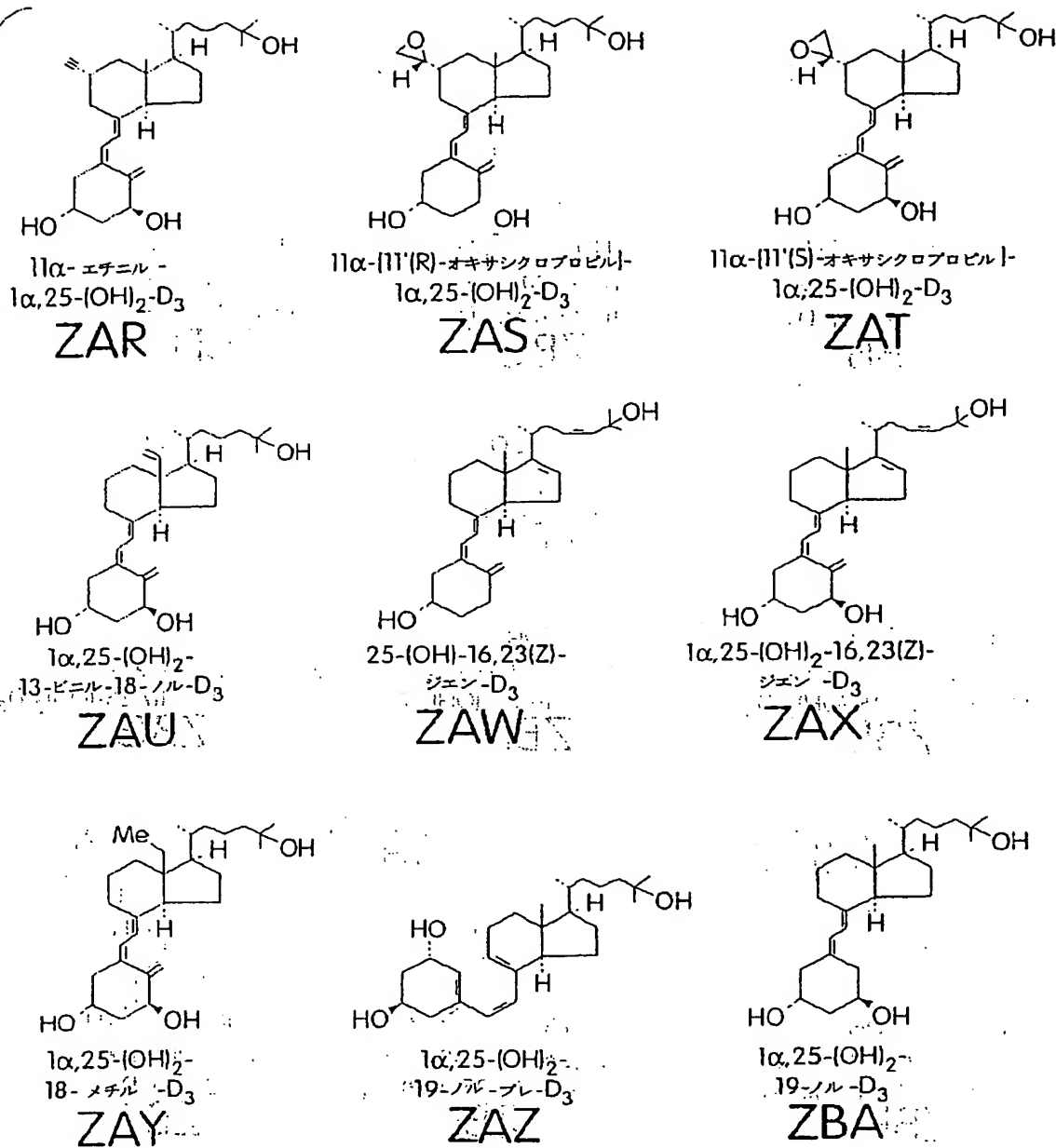


Fig. 1Cont.

【図1】

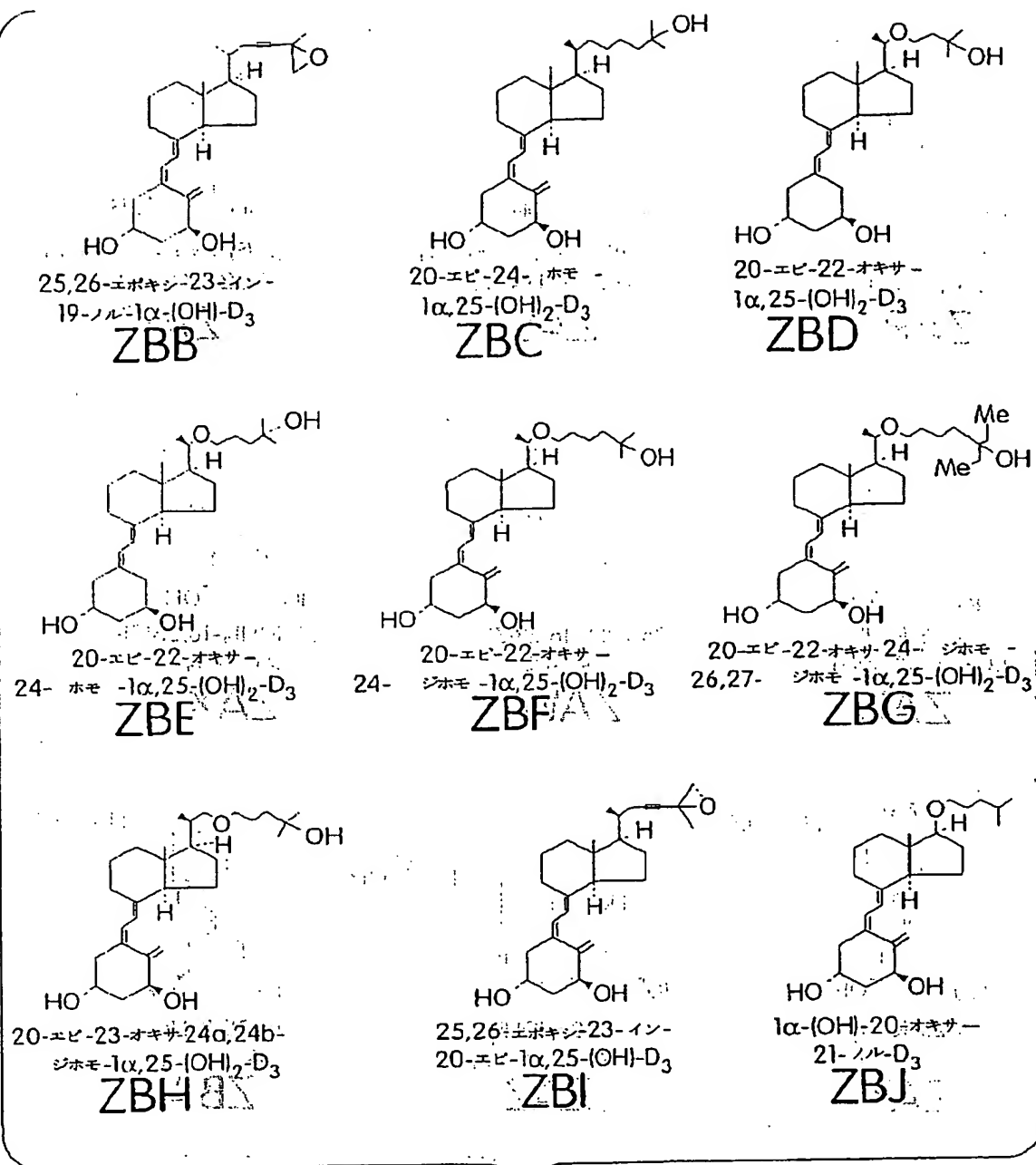


Fig. 1 Cont.

【図1】

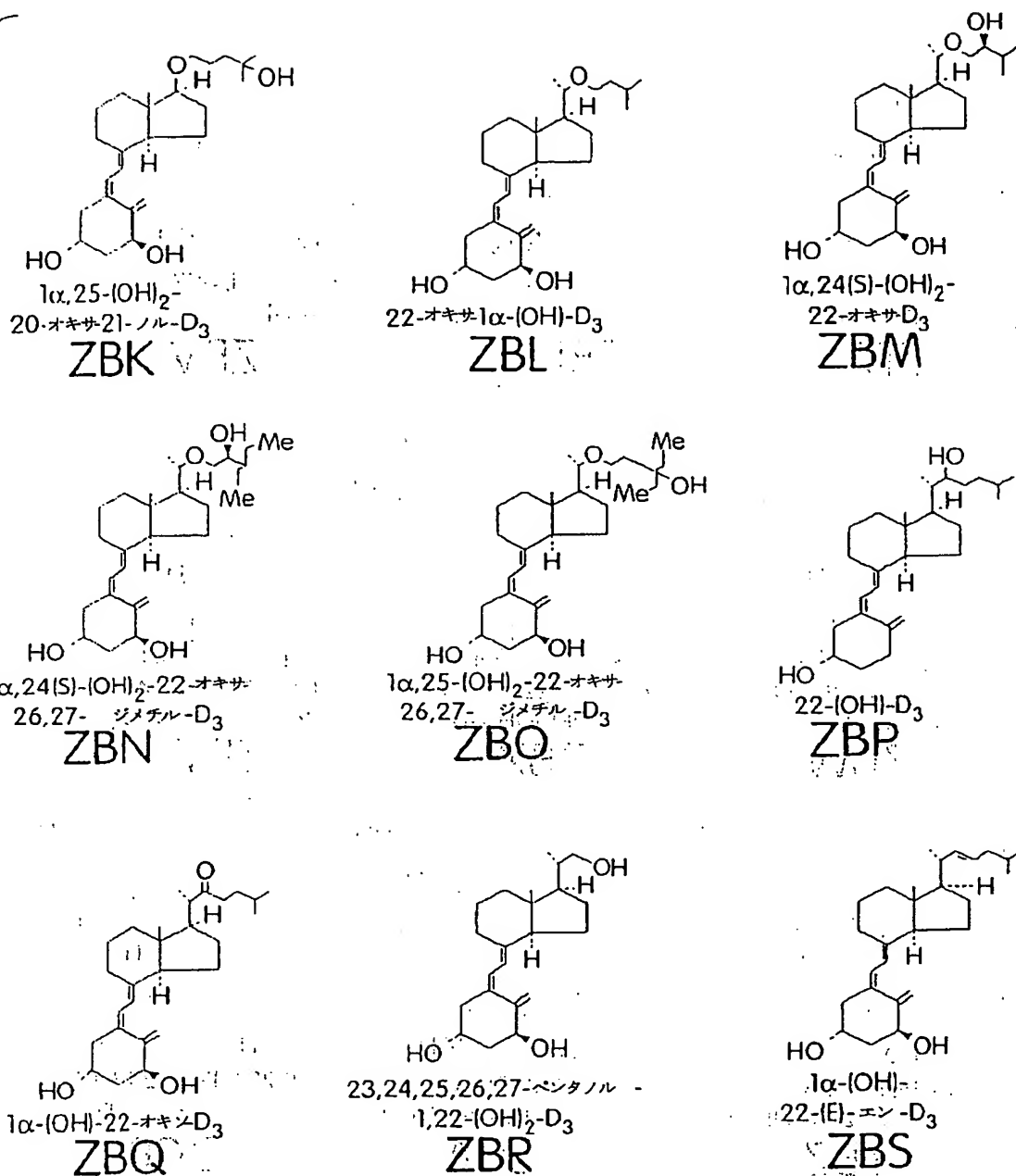


Fig. 1Cont.

【図1】

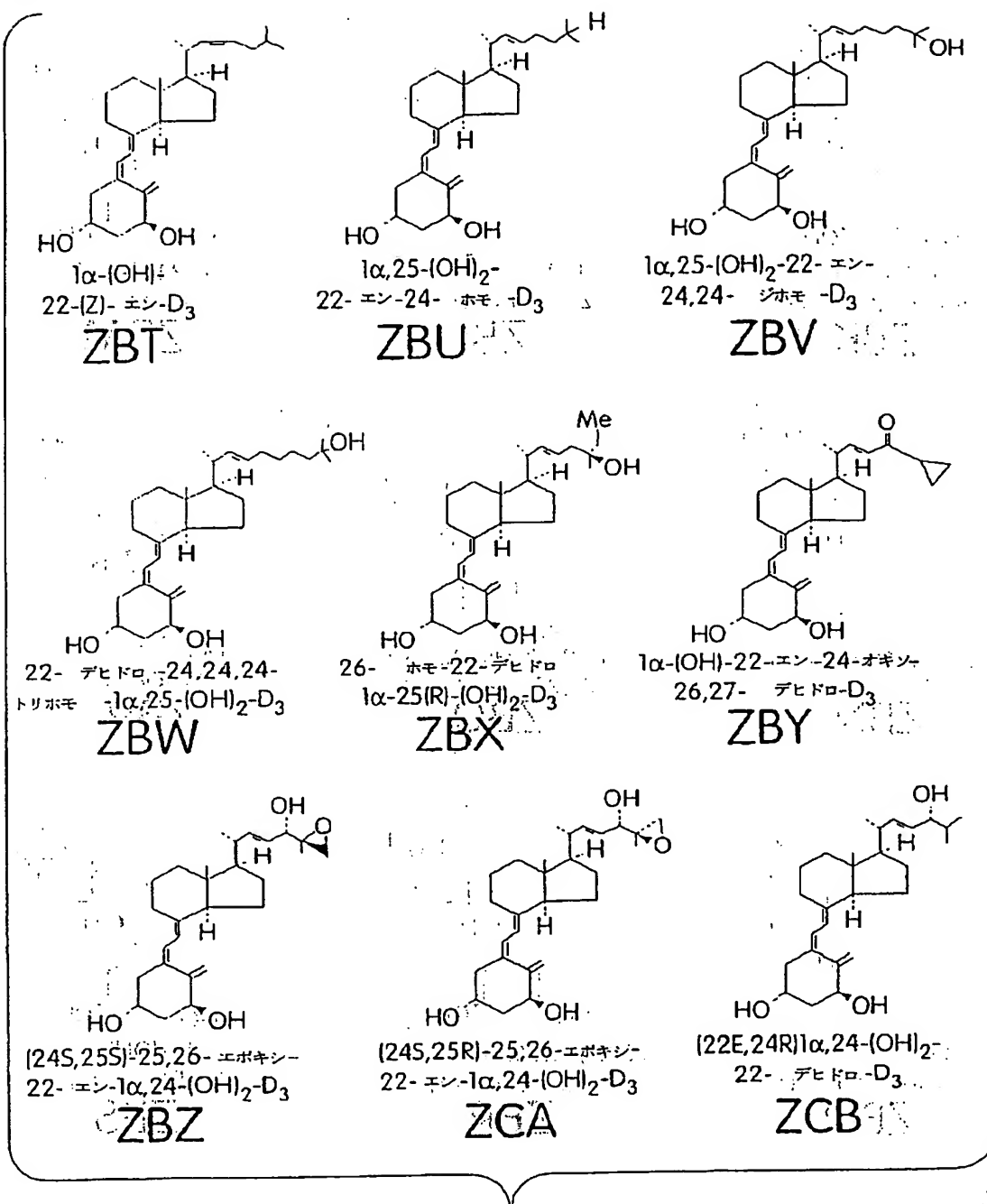


Fig. 1 Cont.



【図1】

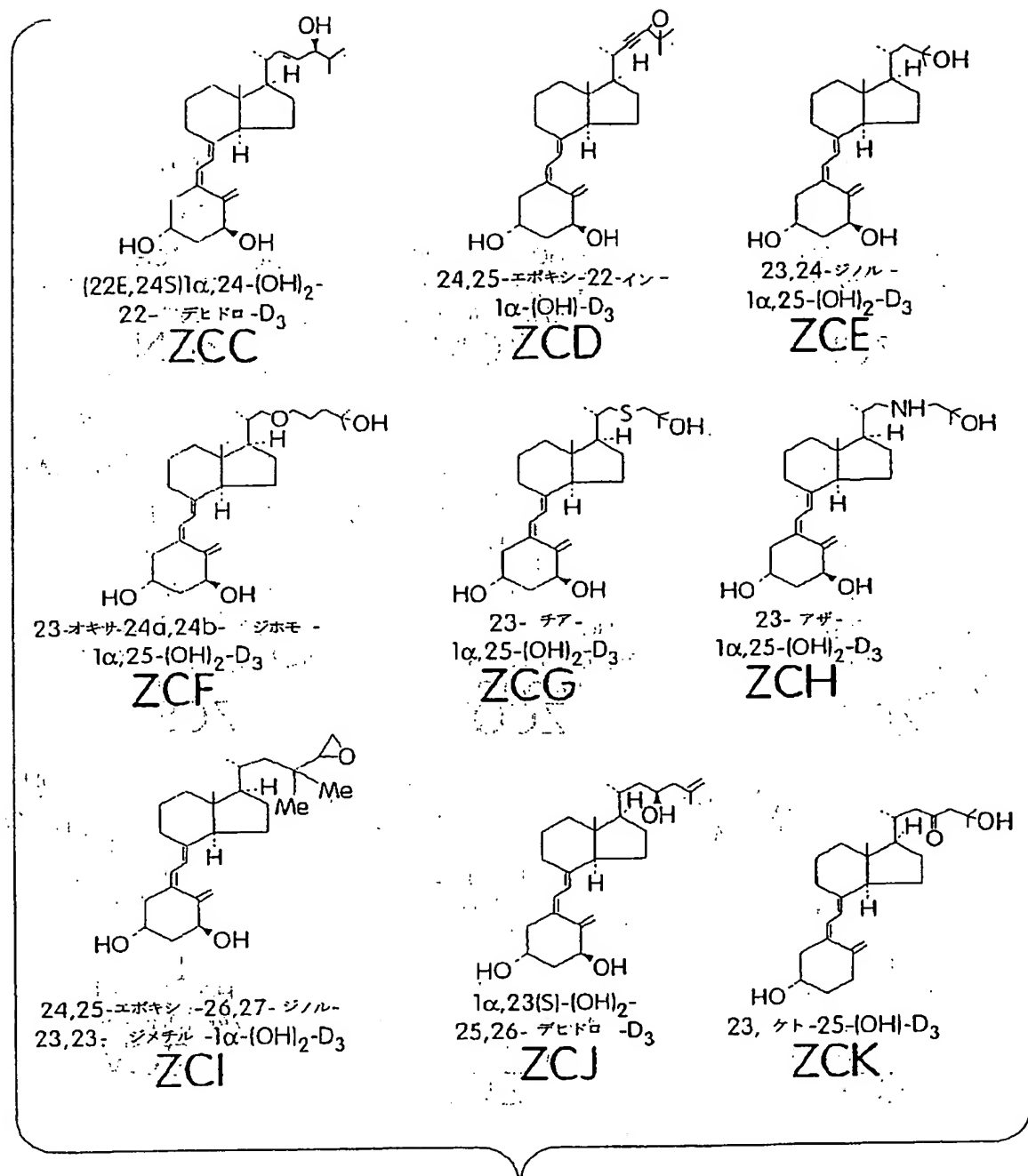


Fig. 1Cont.

【図1】

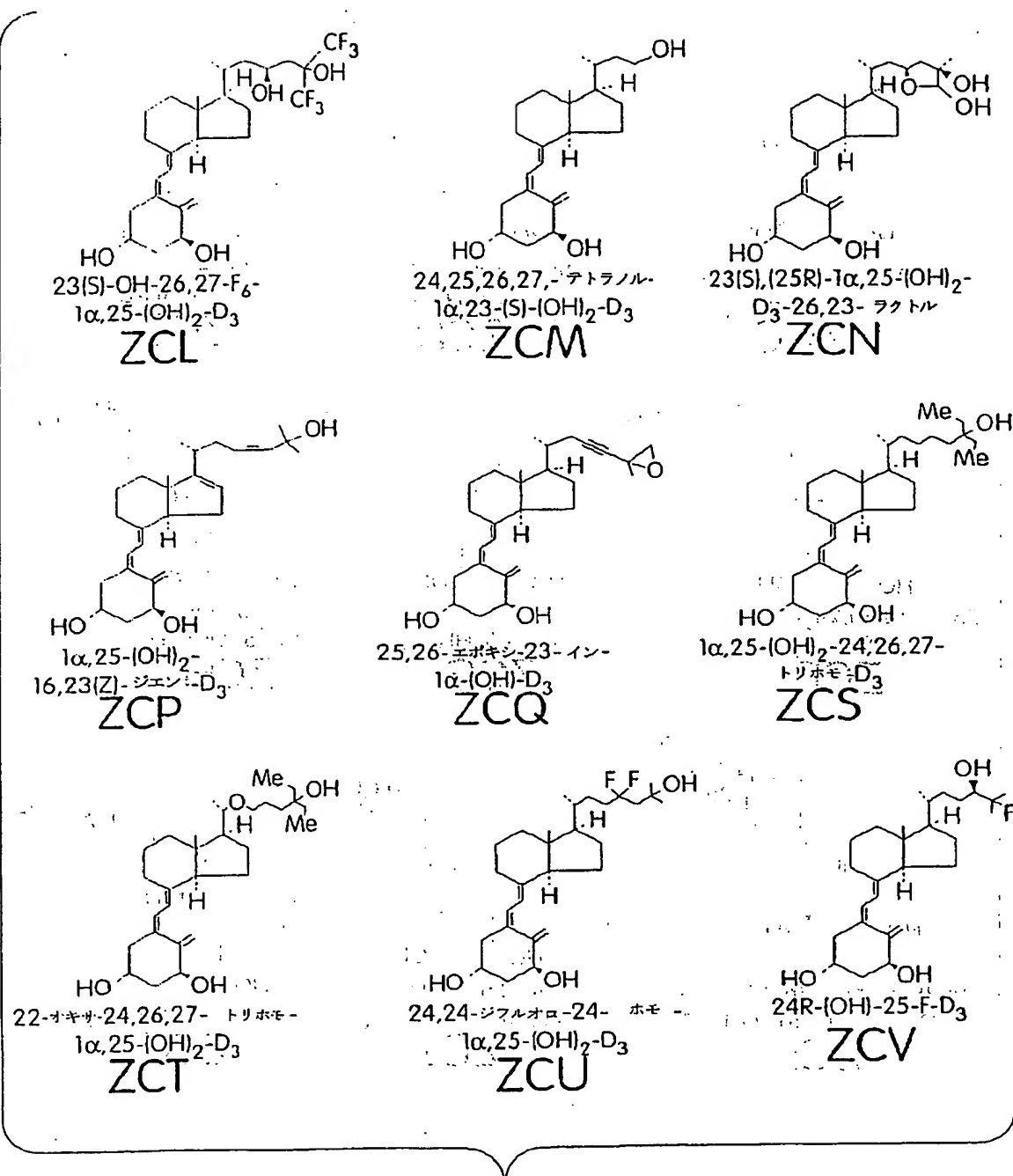


Fig. 1 Cont.

【図1】

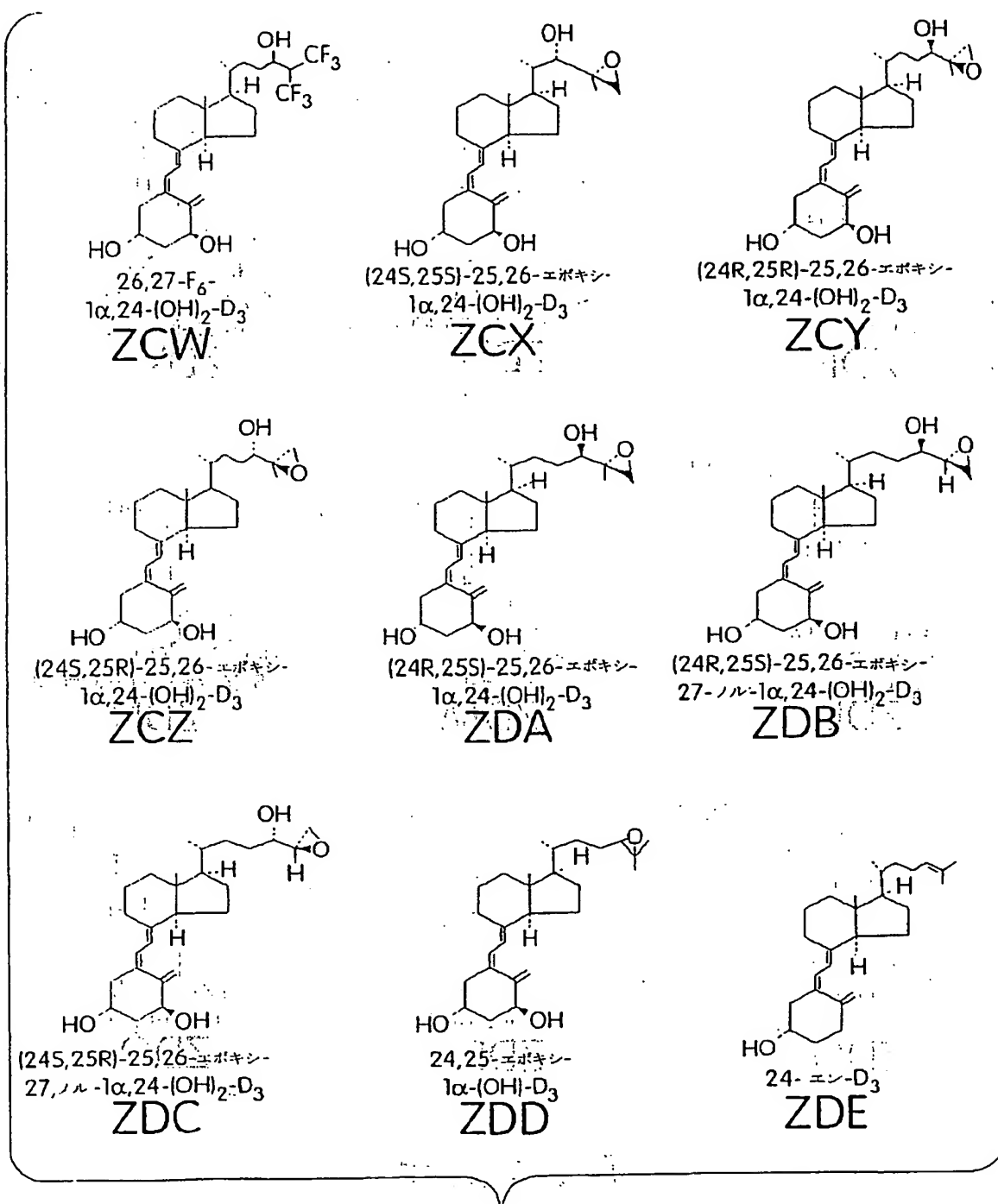


Fig. 1Cont.

【図1】

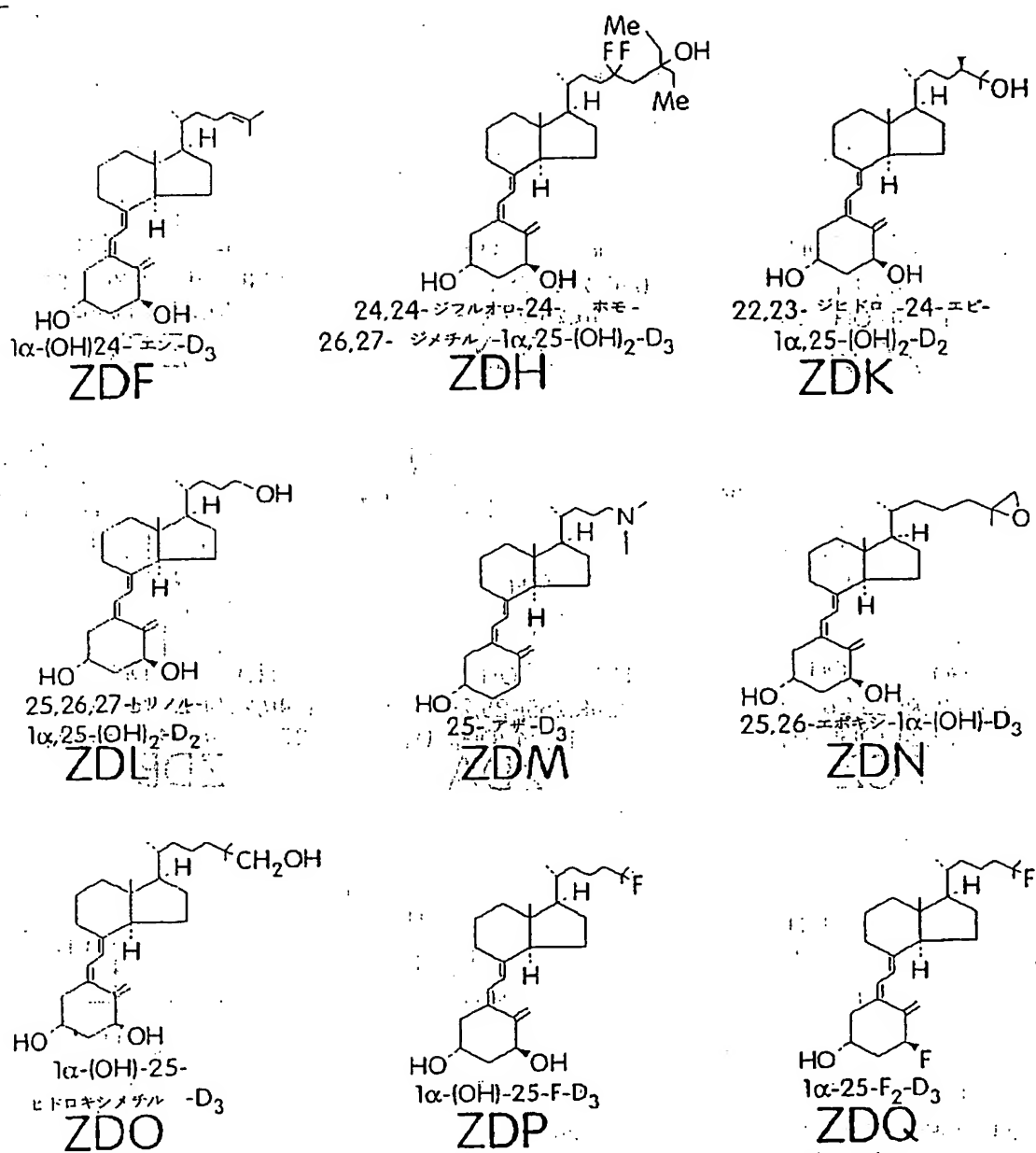


Fig. 1Cont.

【図1】

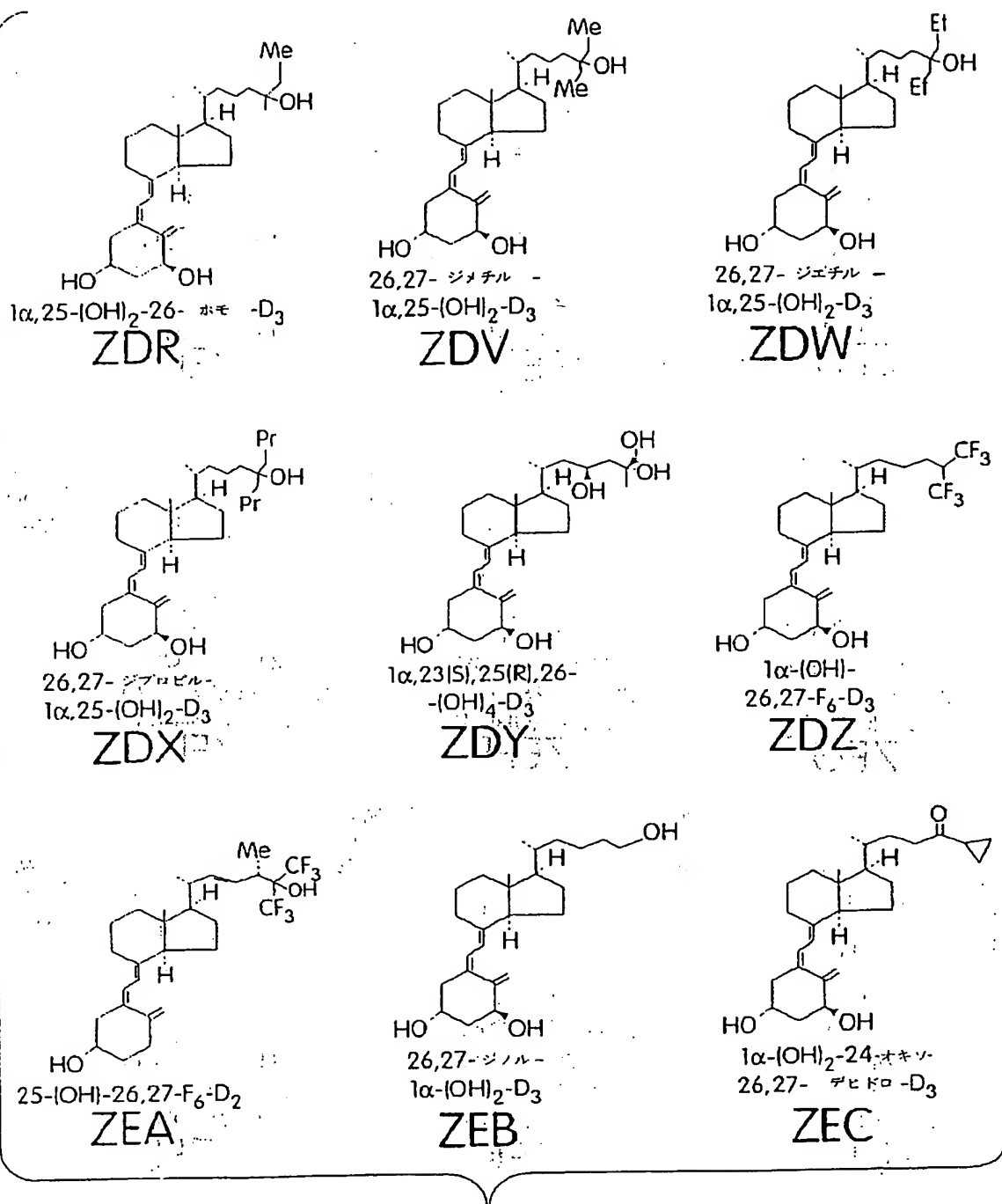


Fig. 1Cont.

【図1】

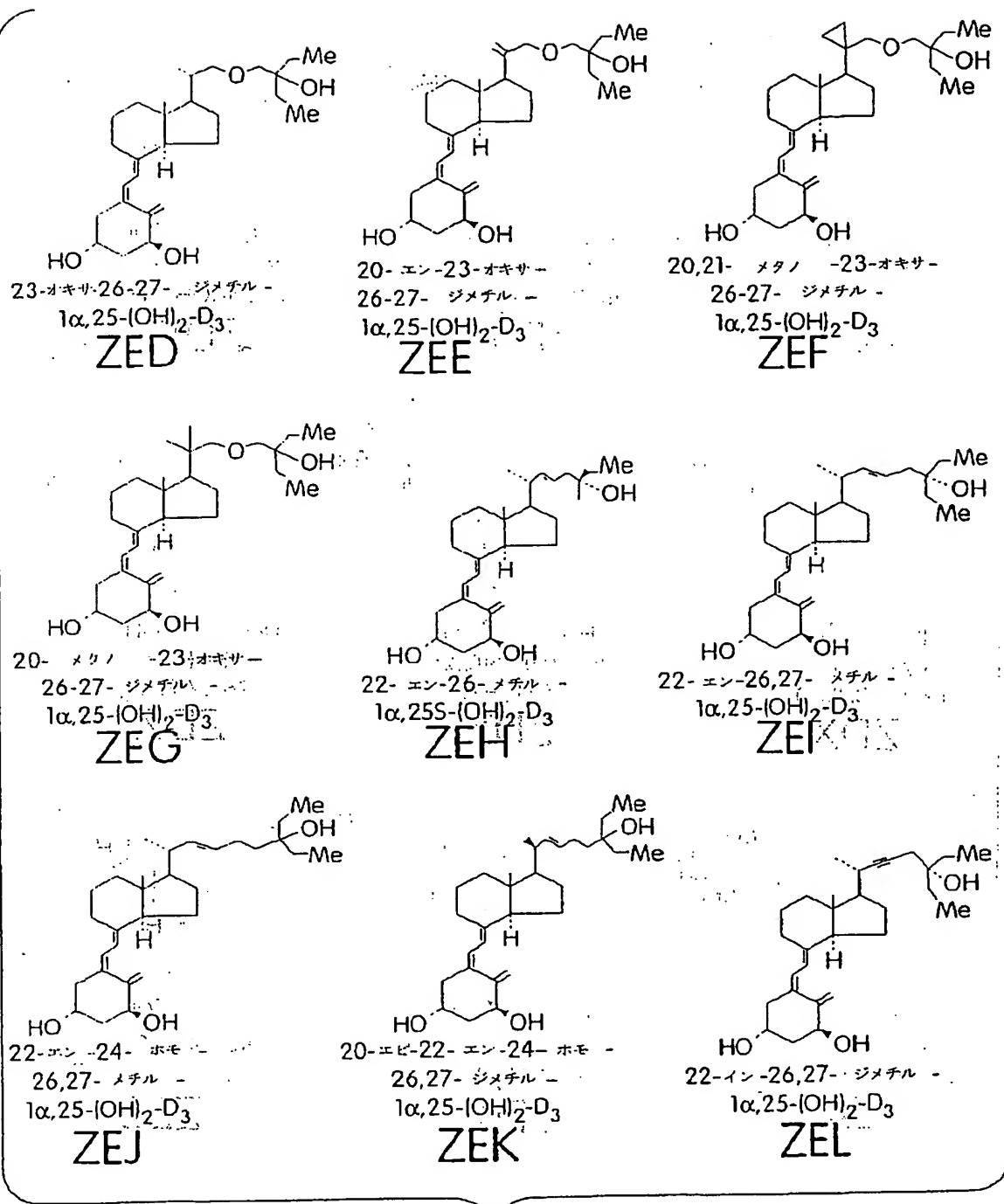


Fig. 1Cont.

【図1】

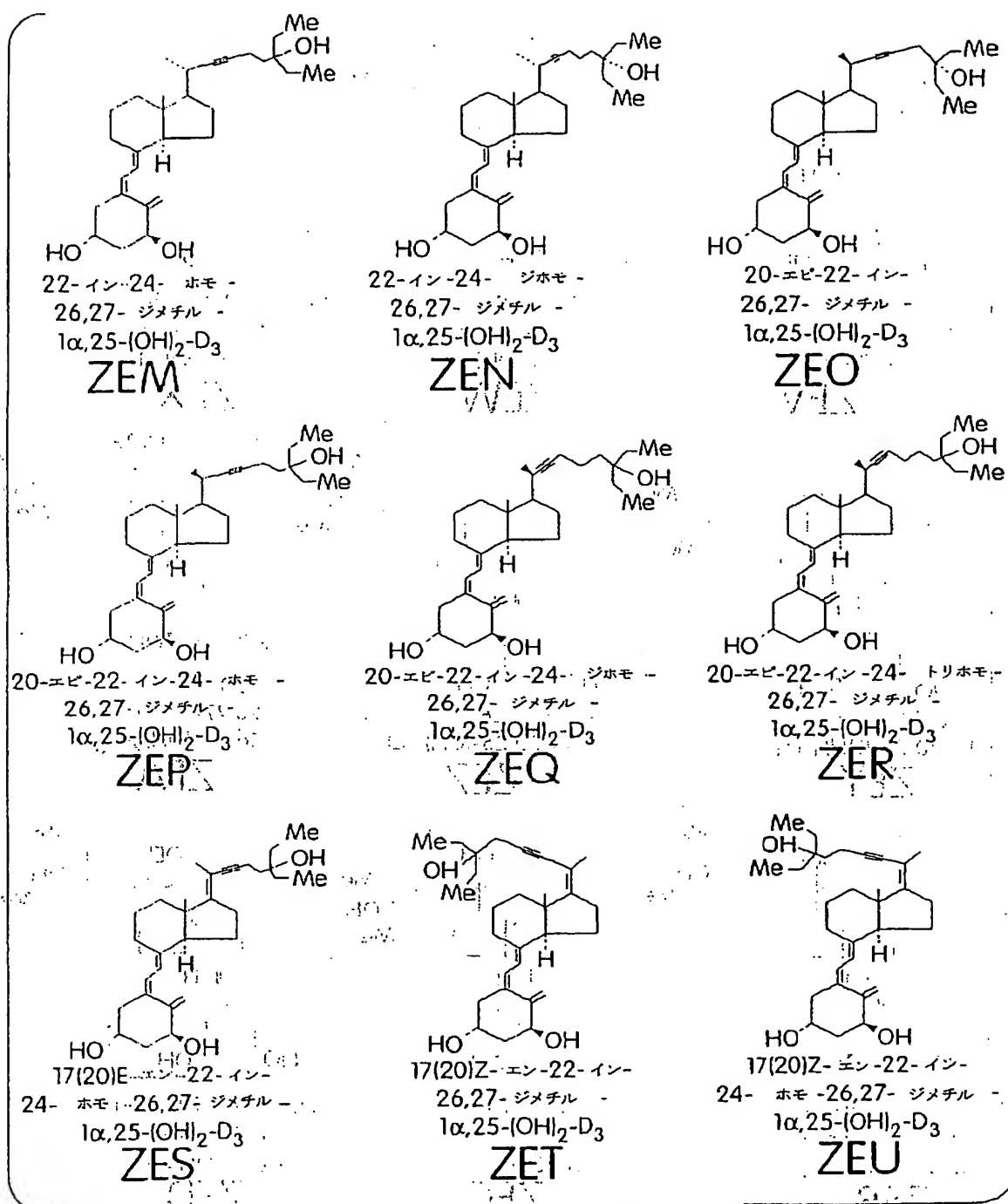


Fig. 1Cont.

【図1】

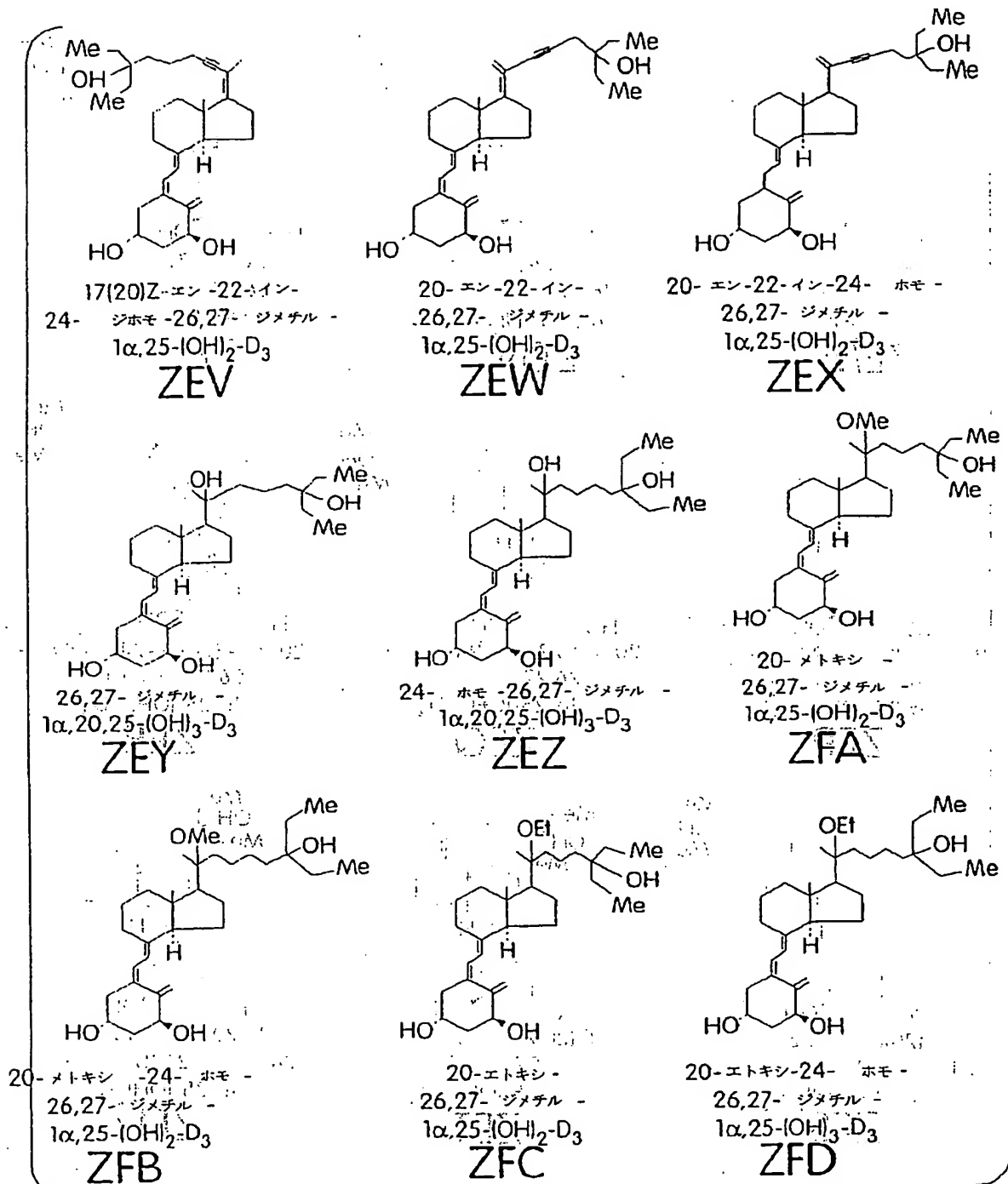


Fig. 1 Cont.



【図1】

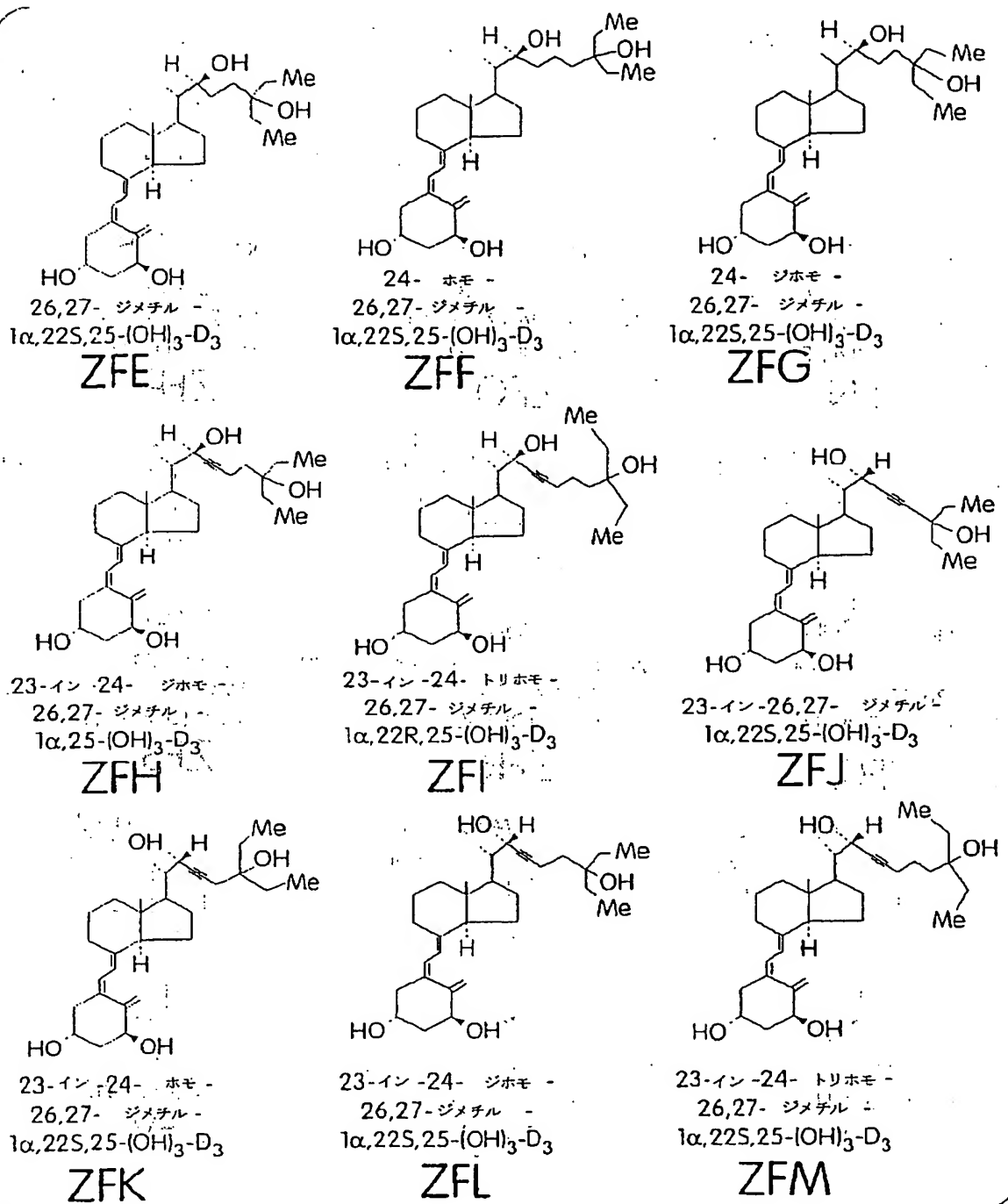


Fig. 1Cont.

【図1】

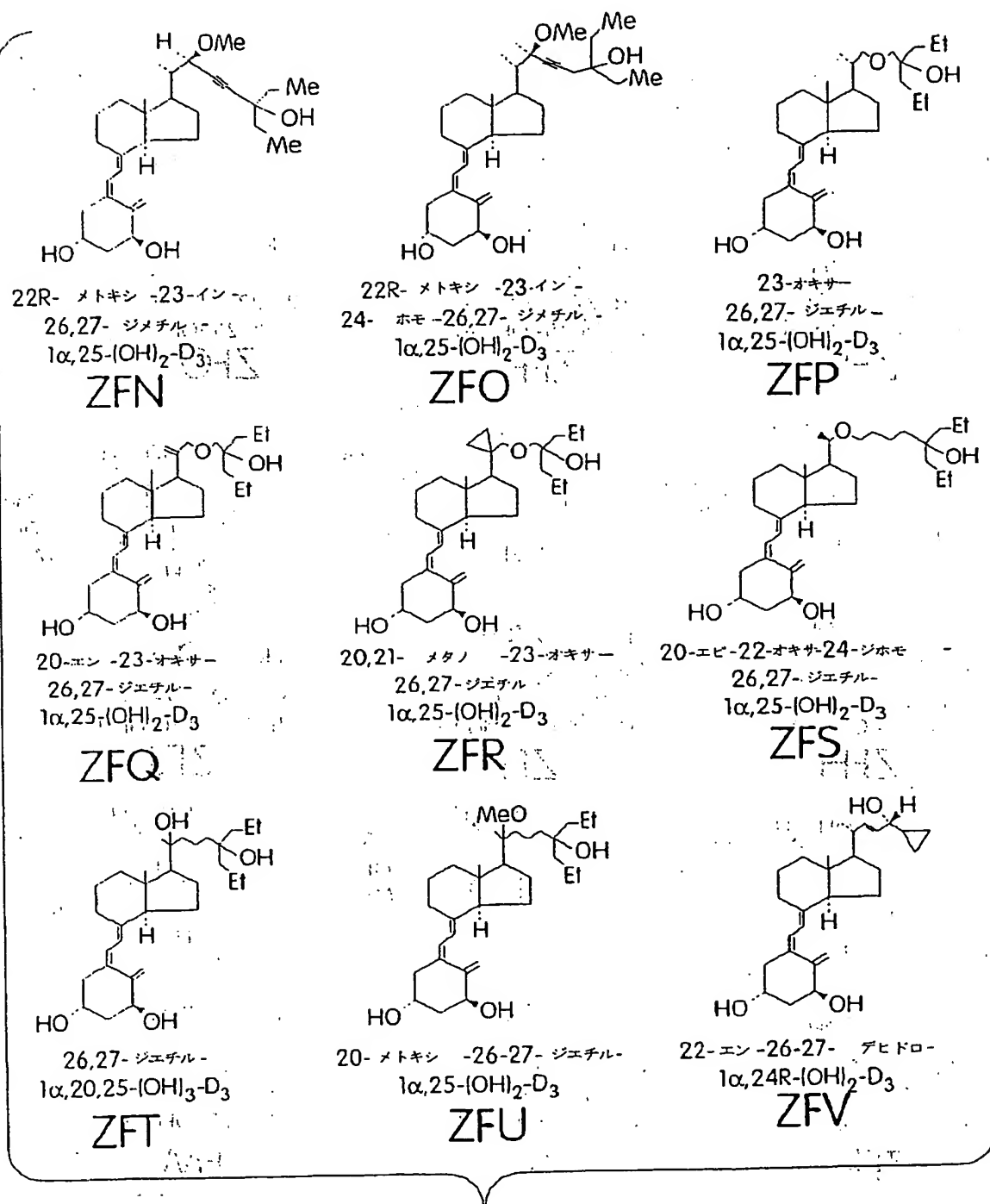


Fig. 1Cont.

【図1】

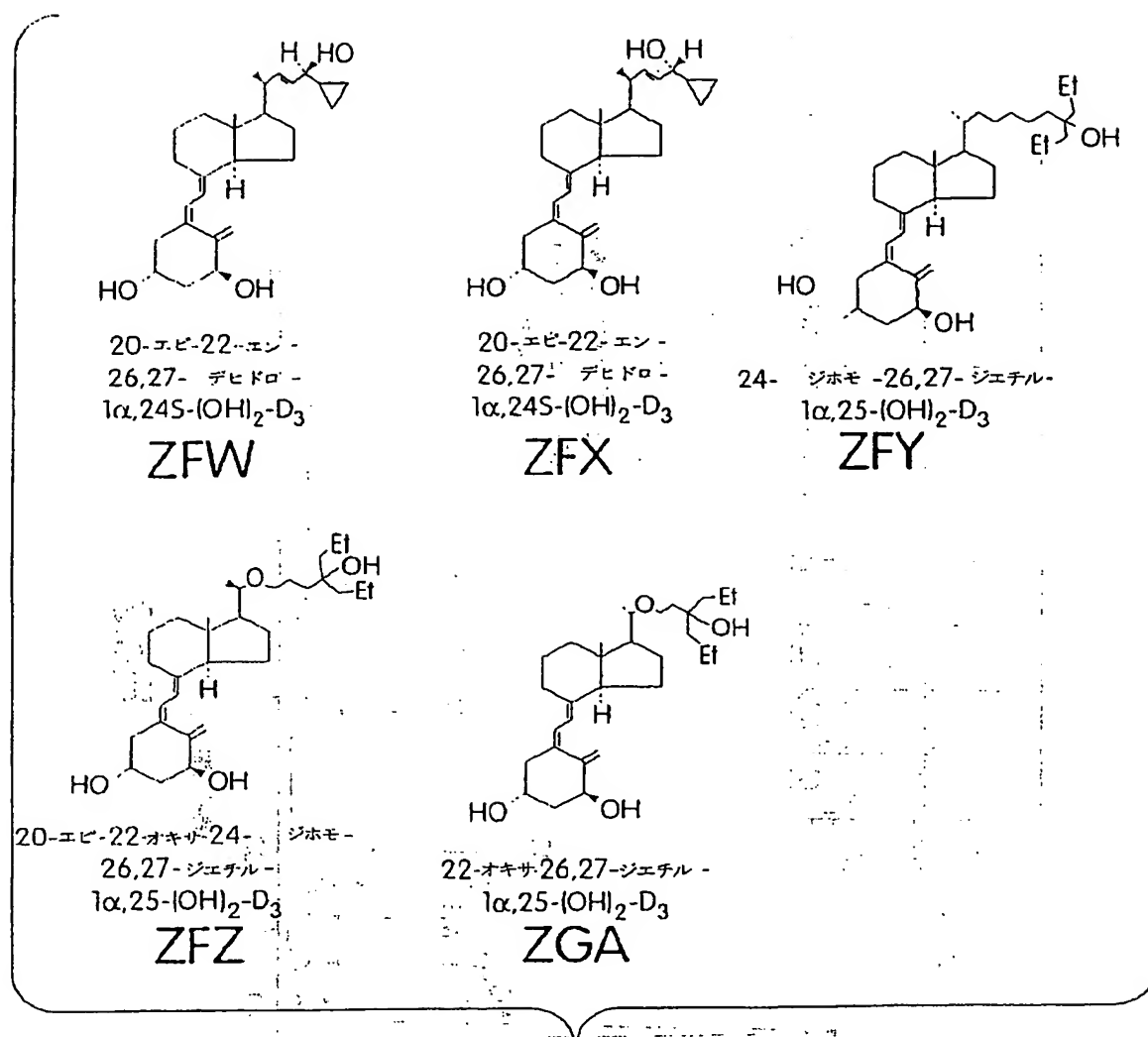
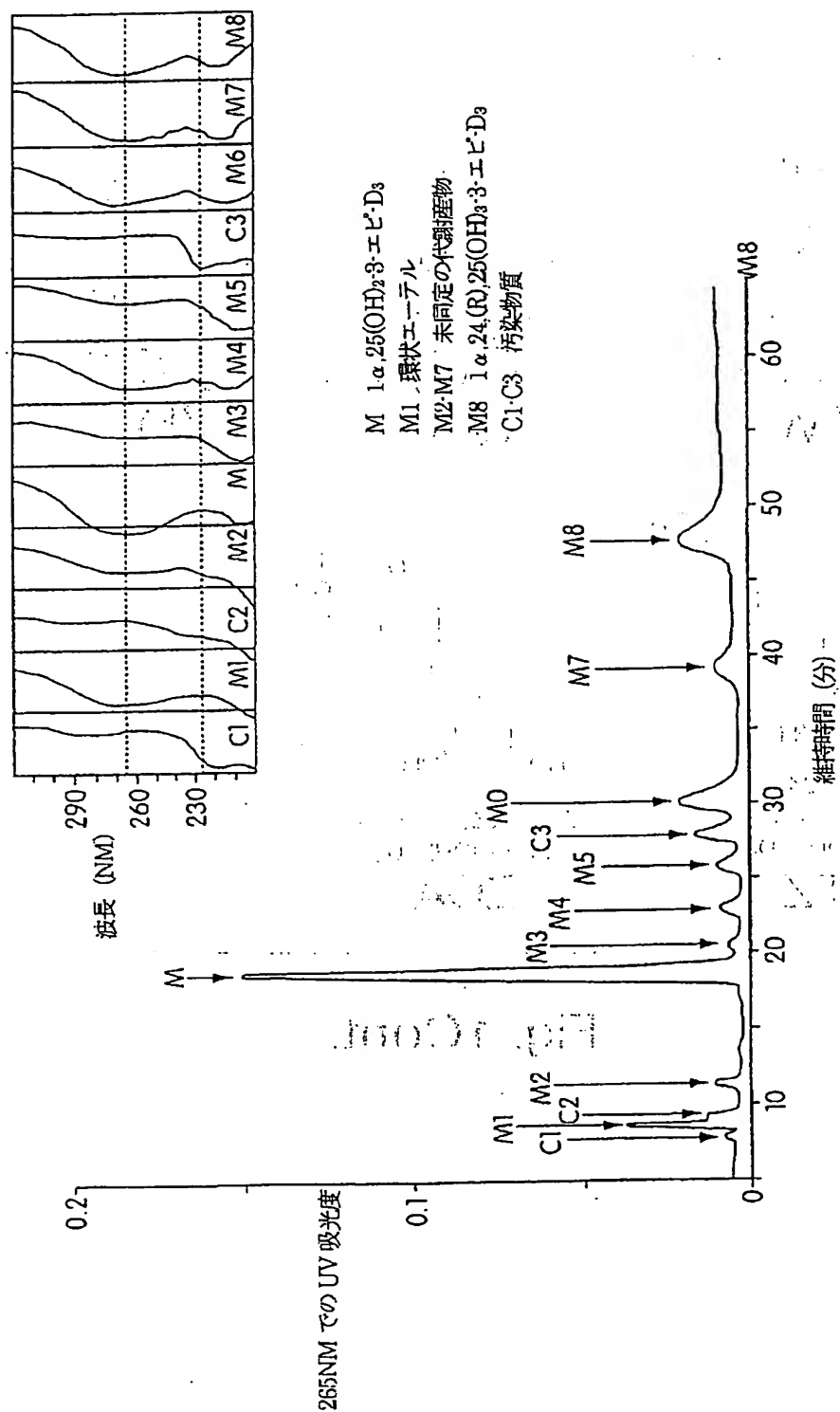


Fig. 1Cont.

【図2】



[图3]

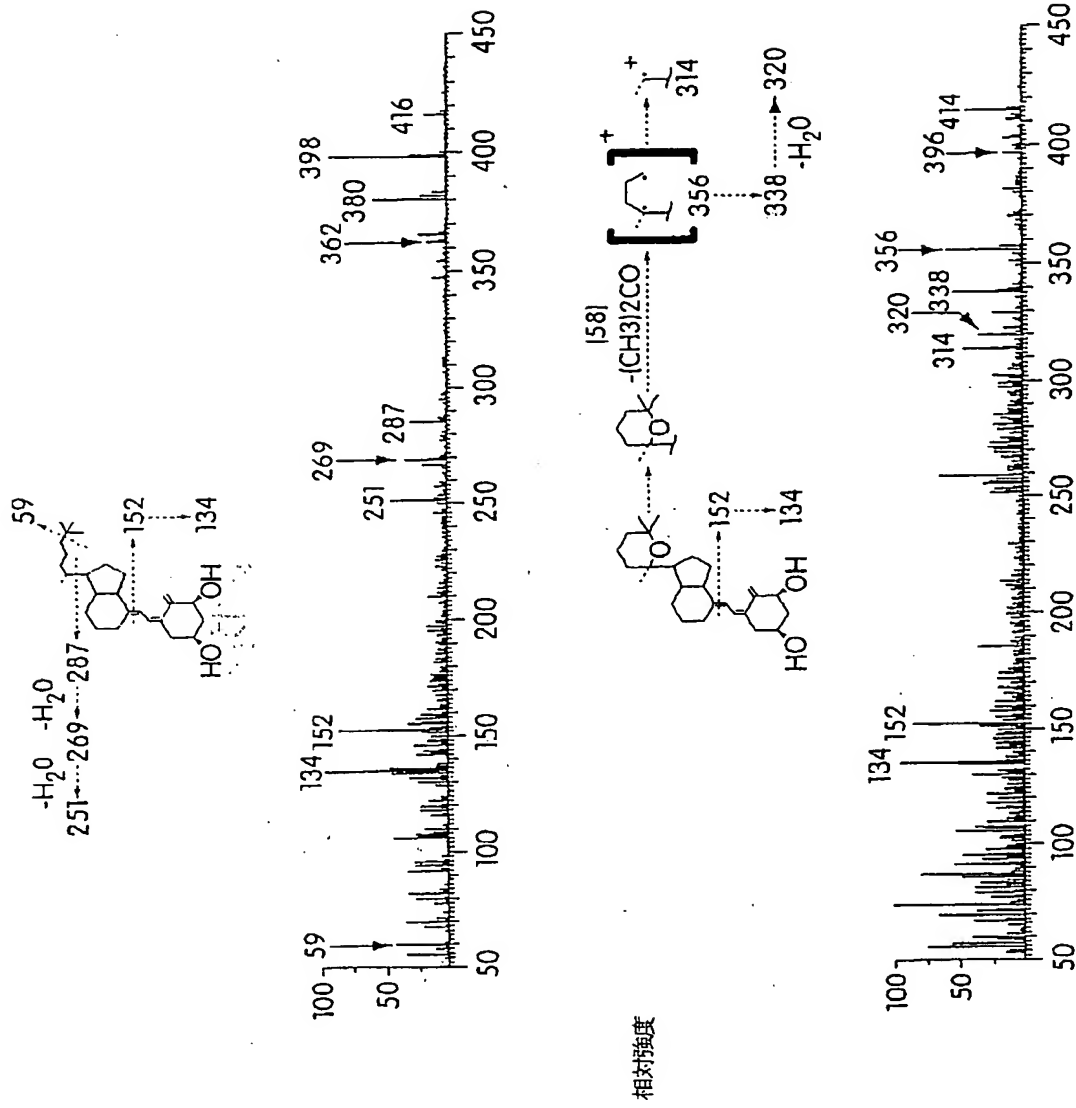


Fig. 3

【図4】

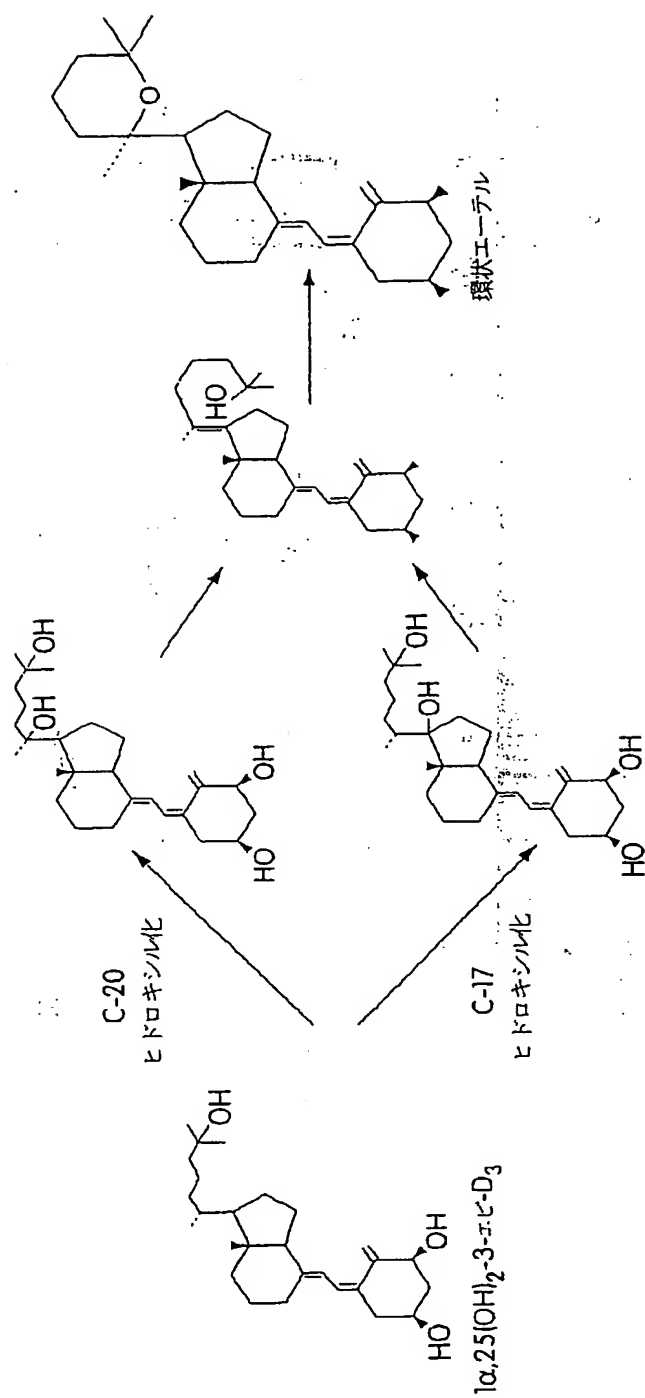
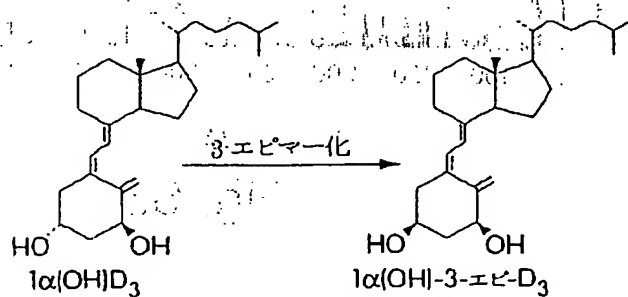
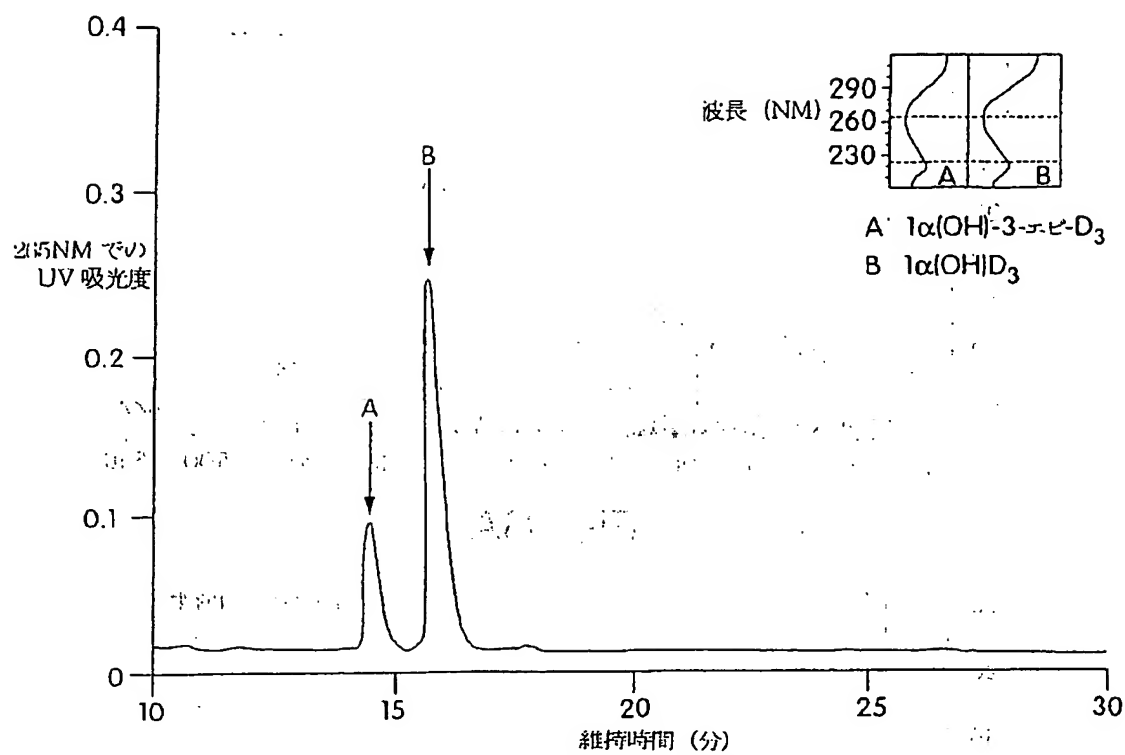


Fig. 4

【図5】



【図6】

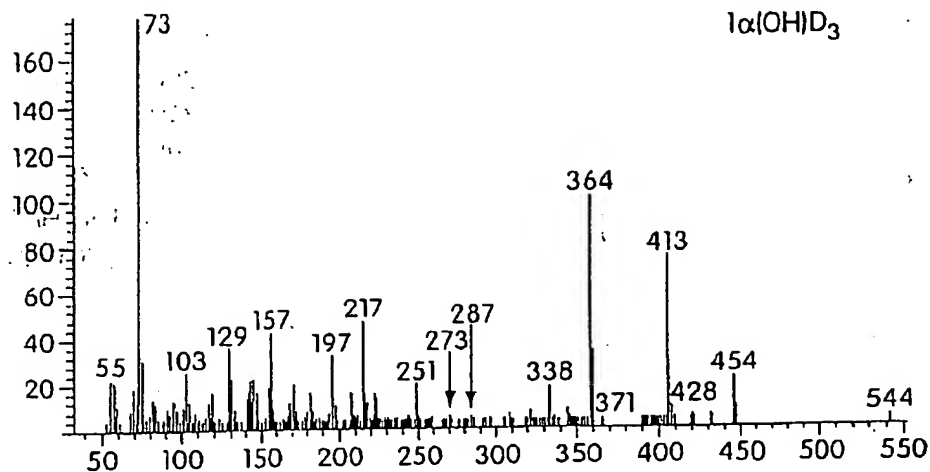


Fig. 6A

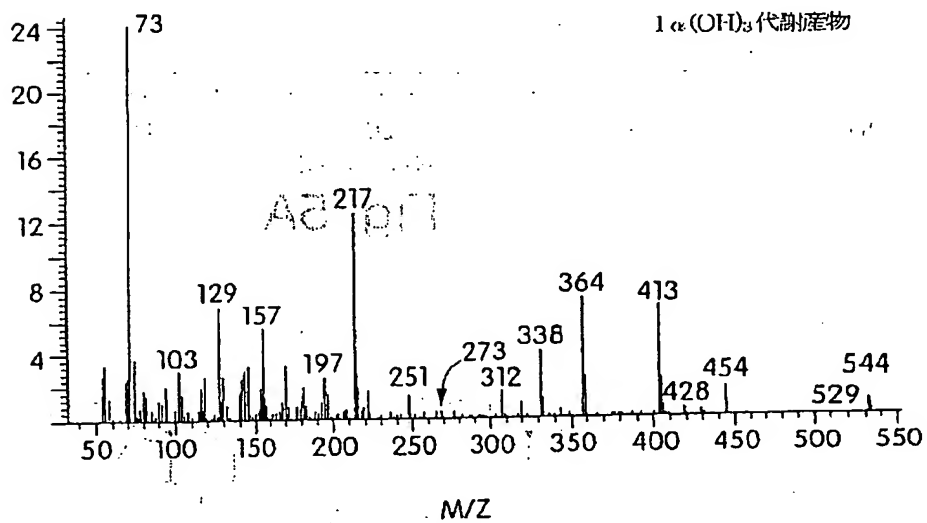


Fig. 6B



【図7】

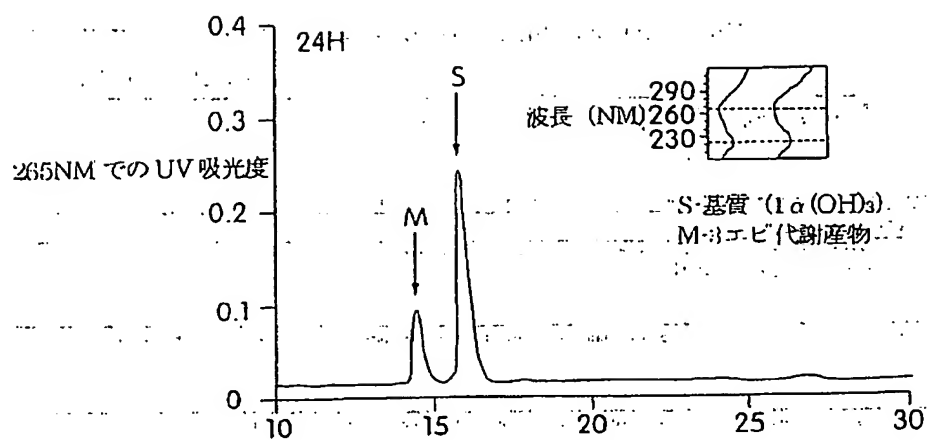


Fig. 7A

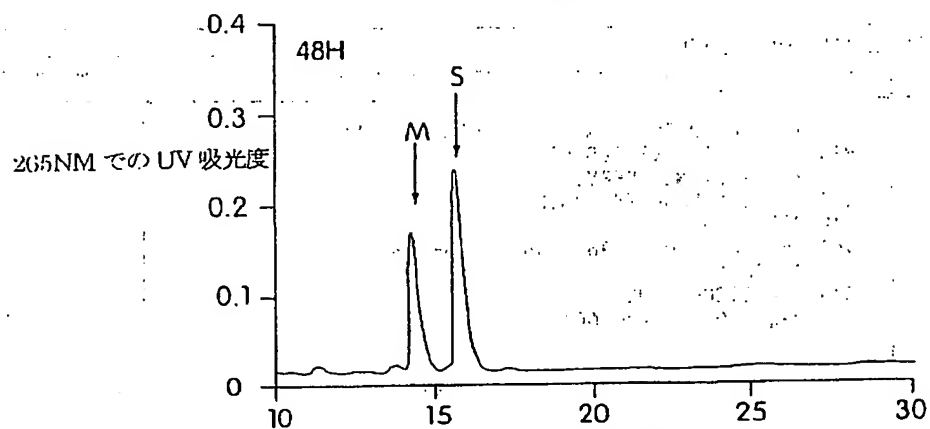


Fig. 7B

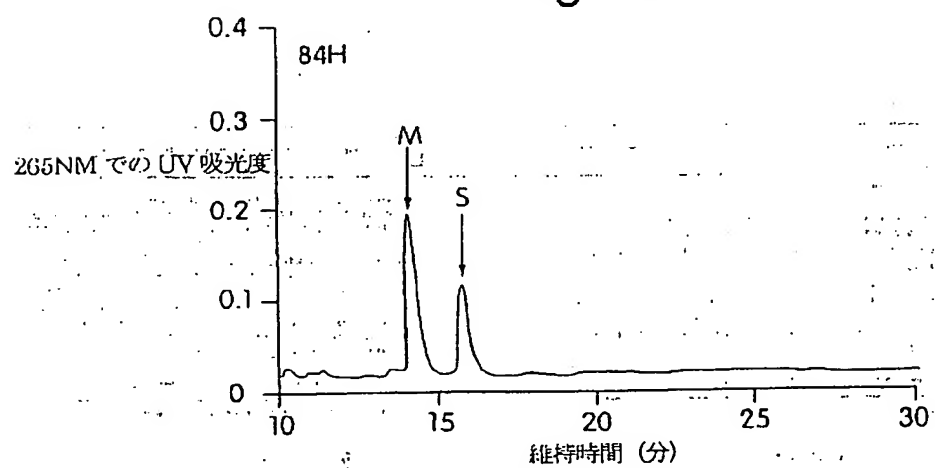


Fig. 7C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Form PCTASA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 98/10062

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	K.R. MURALIDHARAN: "STUDIES ON THE A-RING DIASTEREOMERS OF 1 $\alpha$ ,25-DIHYDROXYVITAMIN D <sub>3</sub> ." JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY vol. 58, no. 7, 1993, pages 1895-1899, XP002076936 EASTON, US see page 1895 - page 1897; figure 4A	2-17
X	W.H. OKAMURA ET AL.: "STUDIES ON VITAMIN D(CALCIFEROL) AND ITS ANALOGUES.13." JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY.. vol. 43, no. 4, 1978, pages 574-580, XP002076937 EASTON, US see page 574 - page 577; figure 32	2,3, 13-15

Form PCT4SA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/10062

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4-14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claims 4-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド (参考)
A 6 1 P 3/14		A 6 1 P 3/14	
5/18		5/18	
17/00		17/00	
19/08		19/08	
19/10		19/10	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
C 0 7 D 309/04		C 0 7 D 309/04	
309/06		309/06	

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, L S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, V N, YU, ZW

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**